

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



DESARROLLO DE NUEVOS ANTAGONISTAS DE LOS
RECEPTORES DE SEROTININA 5-HT₆ Y 5-HT₇

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rocío Almudena Medina Muñoz

Bajo la dirección de los doctores

María Luz López Rodríguez
Bellinda Benhamú Salama

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



**DESARROLLO DE NUEVOS ANTAGONISTAS
DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT₆ Y 5-HT₇**

Memoria que para optar al

TÍTULO DE DOCTOR

presenta

Rocío Almudena Medina Muñoz

Directoras:

Prof. Dra. María Luz López Rodríguez

Prof. Dra. Bellinda Benhamú Salama

MADRID, 2013

A mis padres

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie (1867-1934)

*El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Química Médica del Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la catedrática **Dra. M^a Luz López Rodríguez** y de la Profesora **Dra. Bellinda Benhamú Salama**, a quienes deseo expresar mi más sincera gratitud por su acogida en este grupo de investigación, por sus continuas enseñanzas a lo largo de estos años tanto a nivel profesional como personal, por mostrarme su pasión por la Ciencia y por su confianza en mí.*

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

Al Profesor Dr. Leonardo Pardo, por su acogida en el Laboratorio de Medicina Computacional de la Universidad Autónoma de Barcelona. A Jessica Sallander, por enseñarme a trabajar con modelos computacionales. Y a todo el grupo, por su amabilidad durante mi estancia en Barcelona.

Al Profesor Dr. José Antonio Ramos, por su acogida en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la UCM, así como por su supervisión de los ensayos biológicos.

Al Profesor Dr. Peter B. Hedlund (Scripps Research Institute, EEUU), por la realización de los ensayos de actividad farmacológica en modelos in vivo.

A los catedráticos Dr. Joaquín Plumet y Dr. Guillermo Orellana, por mi admisión en el Departamento de Química Orgánica I de la UCM. Asimismo, quiero agradecer a Soledad Martínez Real, secretaria del Departamento, su inestimable ayuda a lo largo de estos años.

A mis compañeros de laboratorio Ainoa, Ana, Ángel, Carlos, Carolina, Cyrielle, Clément, David, Débora, Dulce, Fátima, Gloria, Gustav, Henar, Inés, Isa, Javi, Jorge, José, Laura, Leticia, Lidia, Mar, Marga, Marisa, Marta, Nacho, Nono, Paco, Raquel, Samanta, Silvia, Tania y Violeta; a María, Onintza, Eva, Moisés, Marina y Jutta de la Facultad de Medicina de la UCM; así como a Laura y a los demás compañeros del departamento. Especialmente a los que me han acompañado desde el principio, por todo el tiempo compartido, todo lo que hemos aprendido unos de otros, los buenos momentos juntos, el apoyo en los momentos complicados y la amistad que nos une.

Y por último, a Jorge, por nuestro tiempo juntos. A mis padres y mis hermanas, Manu e Inés, por estar conmigo. Al resto de mi familia y amigos. A quienes han estado conmigo en alguna etapa de estos años. A quienes habrían querido estar. Y especialmente a los que están ahora.

ÍNDICE

CAPÍTULO A. NUEVOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₇

A.1. INTRODUCCIÓN	1
A.1.1. EL RECEPTOR 5-HT ₇	4
A.1.2. LIGANDOS 5-HT ₇ . APLICACIONES TERAPÉUTICAS	7
A.1.2.1. Depresión	8
A.1.2.2. Alteraciones del sueño	9
A.1.2.3. Trastorno cognitivo: memoria y aprendizaje	9
A.1.2.4. Migraña	10
A.1.2.5. Dolor	10
A.2. RESULTADOS PREVIOS Y OBJETIVOS	13
A.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
A.3.1. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS I (1-20) (<i>HIT TO LEAD</i>)	19
A.3.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AFINIDAD POR EL 5-HT ₇ R, SELECTIVIDAD FRENTE AL 5-HT _{1A} R Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL (<i>HIT TO LEAD</i>)	22
A.3.3. OPTIMIZACIÓN DEL <i>LEAD</i>	25
A.3.4. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DEL ANTAGONISTA UCM-20509 (42) EN MODELOS IN VIVO	32
A.4. PARTE EXPERIMENTAL	35
A.4.1. SÍNTESIS	37
A.4.1.1. 2-(ω -Bromoalquil)isoindolin-1-onas, 21 y 22	37
A.4.1.2. Derivados halogenados de 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, 23-29, 47, 48	38
A.4.1.3. 2-Bromo-6-nitroacetanilida, 33	41
A.4.1.4. 2-Amino-3-bromoanilina, 34	42
A.4.1.5. 4-Bromo-1H-bencimidazol, 35	42
A.4.1.6. 4-Bromo-1-tritil-1H-bencimidazol, 32	43
A.4.1.7. 1-(1-Naftil)- y 1-(1-tritil-4-bencimidazolil)piperazinas, 30 y 31	43
A.4.1.8. ω -(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)alcanoles, 38 y 39	44

A.4.1.9. 2-(ω -Cloroalquil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas, 36 y 37	44
A.4.1.10. Compuestos de estructura general I , 1-18, 40-46	45
A.4.1.11. 1-[ω -(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-il)alquil]-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -indol-2-onas, 19 y 20	56
A.4.2. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE RADIOLIGANDO	57
A.4.2.1. Receptor serotoninérgico 5-HT ₇	57
A.4.2.2. Receptor serotoninérgico 5-HT _{1A}	57
A.4.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA	58
A.4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN MICROSOMAS DE RATA Y HUMANOS	58
A.4.5. ENSAYO DE HIPOTERMIA IN VIVO	58
A.4.6. TEST DE SUSPENSIÓN POR LA COLA	59
A.4.7. TEST DE NATACIÓN FORZADA	59
A.4.8. MÉTODOS COMPUTACIONALES DE SIMULACIÓN DE LOS COMPLEJOS LIGANDO-RECEPTOR	59
A.5. CONCLUSIONES	61
A.6. BIBLIOGRAFÍA	65
 CAPÍTULO B. NUEVOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₆	
B.1. INTRODUCCIÓN	73
B.1.1. EL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT ₆	75
B.1.2. LIGANDOS 5-HT ₆ . APLICACIONES TERAPÉUTICAS	76
B.1.2.1. Trastorno cognitivo. Enfermedad de Alzheimer	77
B.1.2.2. Control del apetito. Obesidad y síndrome metabólico	79
B.1.2.3. Ligandos 5-HT ₆ en desarrollo clínico	79
B.2. RESULTADOS PREVIOS Y OBJETIVOS	83
B.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
B.3.1. BÚSQUEDA DE <i>HITS</i> EN UNA SERIE INICIAL DE COMPUESTOS I (1-12)	89
B.3.2. PROCESO <i>HIT TO LEAD</i>	96
B.3.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA IN VIVO DEL ANTAGONISTA UCM-306 (39)	100

B.4. PARTE EXPERIMENTAL	103
B.4.1. SÍNTESIS	105
B.4.1.1. Reducción de 2-nitroanilinas y nitrobenzimidazoles por hidrogenación catalítica.	
Procedimiento general	105
B.4.1.2. Ciclación de fenilendiaminas en medio ácido. Procedimiento general	106
B.4.1.3. Formación de amidas vía cloruro de ácido. Procedimiento general	106
B.4.1.4. Formación de amidas a partir de ácido carboxílico. Procedimiento general	106
B.4.1.5. <i>N</i> -Alquilación de derivados de benzimidazol. Procedimiento general	106
B.4.1.6. Sustitución nucleófila de <i>o</i> -nitro y <i>p</i> -nitrofluorobencenos. Procedimiento general	107
B.4.1.7. Ciclación reductora de 2-nitroanilinas. Procedimiento general	107
B.4.1.8. Formación de sulfonamidas. Procedimientos generales	107
B.4.1.9. Reducción de amidas. Procedimiento general	107
B.4.1.10. 2-Amino-3-metilnilina, 13	108
B.4.1.11. 4-Metilbenzimidazol, 14	108
B.4.1.12. Síntesis del ácido 4-benzimidazolcarboxílico, 15	108
B.4.1.13. <i>N</i> -Fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol-4-carboxamida, 16	108
B.4.1.14. 1-[2-(Dimetilamino)etil]- <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol-4-carboxamida, 1	109
B.4.1.15. <i>N</i> -Fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxamida, 17	109
B.4.1.16. 4-{[2-(Dimetilamino)etil]amino}-3-nitrobenzoato de metilo, 18	110
B.4.1.17. Síntesis del ácido 1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxílico, 19	110
B.4.1.18. 1-[2-(Dimetilamino)etil]- <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxamida, 5	110
B.4.1.19. 3-{[2-(Dimetilamino)etil]amino}-4-nitrobenzoato de metilo, 20	111
B.4.1.20. Síntesis del ácido 1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -benzimidazol-6-carboxílico, 21	111
B.4.1.21. 1-[2-(Dimetilamino)etil]- <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol- 6-carboxamida, 9	111
B.4.1.22. 4-Nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol, 22	112
B.4.1.23. <i>N,N</i> -Dimetil-2-(4-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)etanamina, 23	112
B.4.1.24. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -4-aminobenzimidazol, 24	112
B.4.1.25. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -benzimidazol-4-il}benzamida, 2	113
B.4.1.26. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -benzimidazol-4-il}bencenosulfonamida, 4	113
B.4.1.27. <i>N</i> -bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -4-aminobenzimidazol, 3	114

B.4.1.28. <i>N</i> ¹ -[2-(Dimetilamino)etil]-4-nitrobenceno-1,2-diamina, 25	114
B.4.1.29. <i>N,N</i> -Dimetil-2-(5-nitro-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)etanamina, 26	114
B.4.1.30. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -5-aminobencimidazol, 27	115
B.4.1.31. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il}benzamida, 6	115
B.4.1.32. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il}bencenosulfonamida, 8	115
B.4.1.33. <i>N</i> -Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -5-aminobencimidazol, 7	116
B.4.1.34. <i>N</i> ³ -[2-(Dimetilamino)etil]-4-nitrobenceno-1,3-diamina, 28	116
B.4.1.35. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-il}formamida, 29	116
B.4.1.36. Síntesis de 1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -6-aminobencimidazol, 30	117
B.4.1.37. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-il}benzamida, 10	117
B.4.1.38. <i>N</i> -{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-il}bencenosulfonamida, 12	118
B.4.1.39. <i>N</i> -Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -6-aminobencimidazol, 11	118
B.4.1.40. Bencimidazolsulfonamidas, 31-39	118
B.4.1.41. Síntesis de 5-cloro-3-metilbenzotiofeno-2-carbaldehído, 44	123
B.4.1.42. Síntesis del ácido 5-cloro-3-metil-1-benzotiofeno-2-carboxílico, 45	123
B.4.1.43. Síntesis del ácido 5-bromo-2-naftoico, 46	123
B.4.1.44. Síntesis del ácido 5-cloro-2-naftoico, 47	124
B.4.1.45. 5-Cloro- <i>N</i> -{1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-il}- 3-metilbenzotiofeno-2-carboxamida, 40	124
B.4.1.46. 5-Cloro- <i>N</i> -{1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-il}-2-naftanamida, 42	125
B.4.1.47. <i>N</i> -[(5-Cloro-3-metil-1-benzotiofen-2-il)metil]-1-[2-(dimetilamino)etil]- 1 <i>H</i> -bencimidazol-6-amina, 41	125
B.4.1.48. <i>N</i> -[(5-Cloro-2-naftil)metil]-1-[2-(dimetilamino)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-amina, 43	125
B.4.2. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE RADIOLIGANDO	126
B.4.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA	127
B.4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN MICROSOMAS DE RATA Y HUMANO	127
B.4.5. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CITOCROMO CYP2D6	127
B.4.6. TEST DE MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	128
B.5. CONCLUSIONES	129
B.6. BIBLIOGRAFÍA	133
SUMMARY	139

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society* para el área de química orgánica, revisados en las revistas *Journal of Organic Chemistry* de Enero 2012 (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/joceah/joceah_authguide.pdf) y *Journal of Medicinal Chemistry* de Enero de 2012 (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmr/jmcmr_abbreviations.pdf), empleándose adicionalmente:

AC	adenilato ciclasa
AR	sistema aromático
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo
CAI	centro de asistencia a la investigación
5-CT	5-carboxamidotriptamina
5-HT _{1A} R	receptor serotoninérgico 5-HT _{1A}
5-HT ₆ R	receptor serotoninérgico 5-HT ₆
5-HT ₇ R	receptor serotoninérgico 5-HT ₇
E.E.	error estándar
EL	dominio extracelular
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HTRF	espectroscopía de fluorescencia de tiempo resuelto (<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>)
HYD	región hidrofóbica
NC-IUPHAR	Comité para la nomenclatura de receptores y clasificación de fármacos de la Unión Internacional de Farmacología (<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification</i>)
NSQ	núcleo supraquiasmático
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina
Pd ₂ dba ₃	tris(dibencilidenacetona)dipaladio
PI	centro ionizable
Rto.	rendimiento
TM	hélice transmembrana
Tris-HCl	clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
UCM	Universidad Complutense de Madrid

CAPÍTULO A
NUEVOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₇

A.1. INTRODUCCIÓN

Se estima que el 1-3% del genoma humano codifica para receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptor*, GPCRs), también llamados receptores de siete dominios transmembrana (7TM) (Figura 1).¹⁻³ Los GPCRs constituyen la más amplia y diversa familia de proteínas de membrana implicadas en la señalización celular. Ésta consiste en la activación del receptor por un ligando presente en el entorno extracelular y la subsiguiente transducción de señales hasta el interior de la célula, a través de cambios coordinados en la estructura de sus dominios transmembrana.⁴ Como consecuencia de su alta abundancia, los GPCRs juegan un papel clave en la fisiología celular, controlando procesos tales como el metabolismo, la secreción, la diferenciación y el crecimiento celulares, las respuestas inflamatorias e inmunes o la neurotransmisión. De ahí que su disfunción dé lugar a diversas enfermedades, por lo que naturalmente son considerados dianas terapéuticas de máxima importancia en la investigación actual para el desarrollo de nuevos fármacos con aplicaciones en prácticamente todos los campos de la medicina.^{5,6} De hecho, se estima que el 50-60% de los agentes terapéuticos hoy en día comercializados actúan sobre GPCRs. Estos fármacos representaron aproximadamente 200 billones de euros del mercado mundial al final del siglo XX.

Los receptores para serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) constituyen una de las principales familias de GPCRs y están involucrados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos tales como las funciones cognitivas y de comportamiento.⁷ En la actualidad, teniendo en cuenta los criterios

establecidos por el Comité para la Nomenclatura de Receptores y Clasificación de Fármacos de la Unión Internacional de Farmacología (*Committee for Nomenclature Receptor of the International Union of Pharmacology*, NC-IUPHAR), se reconoce la existencia de catorce subtipos de receptores 5-HT clasificados en siete familias (Figura 2).^{8,9} Todos ellos pertenecen a la clase A de la superfamilia de GPCRs, excepto el 5-HT₃ que es un receptor de canal iónico. La gran diversidad de receptores serotoninérgicos caracterizados actualmente ha puesto de manifiesto la importancia del desarrollo de nuevos ligandos, los cuales permitirán tratamientos farmacológicos más eficaces, así como el descubrimiento de nuevas aplicaciones terapéuticas. En efecto, se estima que en la actualidad alrededor del 90% de las patentes registradas para enfermedades del sistema nervioso central (SNC) contienen agentes serotoninérgicos.

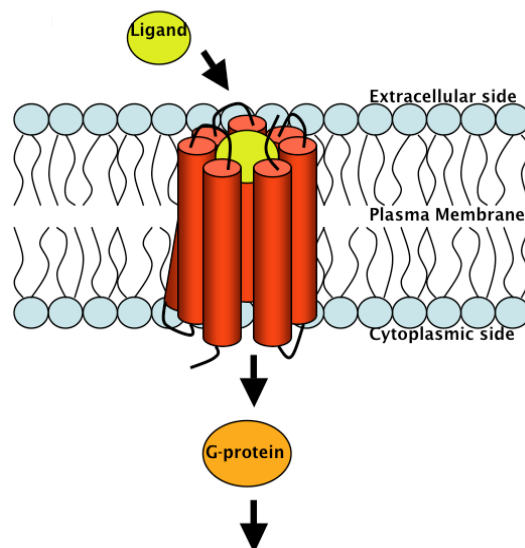


Figura 1. Estructura de los GPCRs, también llamados receptores de 7TM (fuente: *BMC Bioinformatics* 2007, 8, 177).

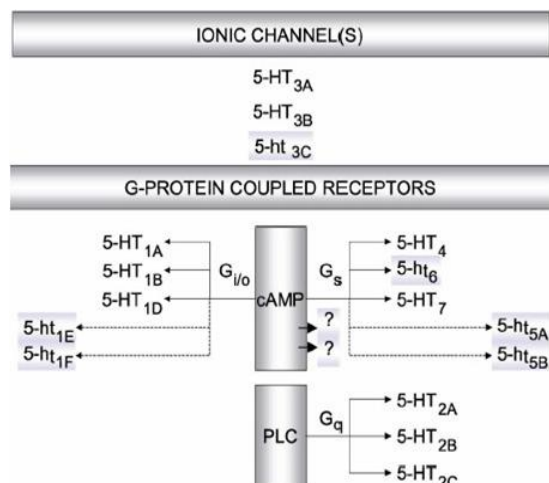


Figura 2. Representación gráfica de la clasificación actual de los receptores 5-HT identificados. La función de los receptores nativos de los subtipos sombreados no ha podido ser demostrada (fuente: Hoyer, D. 2010. Serotonin Receptors. eLS).

Dentro de la heterogénea población de los receptores para serotonina, se han desarrollado agonistas y antagonistas de los subtipos 5-HT₁₋₄ de uso clínico, tales como el ansiolítico buspirona (agonista parcial 5-HT_{1A}), el agente antimigraña sumatriptán (agonista 5-HT_{1D/1F}), el antipsicótico risperidona (antagonista 5-HT_{2/D2}) o el antiemético ondansetrón (antagonista 5-HT₃). También se han realizado importantes progresos en la elucidación de las propiedades funcionales de estos receptores. Por el contrario, se ha avanzado menos en el conocimiento de los subtipos 5-HT₅₋₇,¹⁰⁻¹² debido a su más reciente descubrimiento. No obstante, estos receptores parecen estar implicados en la depresión, la esquizofrenia, el dolor, la memoria y el aprendizaje, los ritmos circadianos, las funciones cardiovasculares, la migraña y el control del apetito, por lo que representan dianas terapéuticas todavía poco exploradas para el desarrollo de nuevos fármacos. En particular, un gran foco de atención lo constituye el estudio del receptor 5-HT₇ (5-HT_{7R}),¹³⁻¹⁵ que representa una de las más recientes aportaciones a la familia de receptores serotoninérgicos.

A.1.1. EL RECEPTOR 5-HT₇

Durante el auge experimentado por la biología molecular, en 1993 varios grupos de investigación clonaron un nuevo receptor para serotonina en diferentes especies (rata, ratón, cobayo y humano) (Figura 3).¹⁶⁻¹⁹ Sin embargo, la identificación del receptor nativo funcional (catalogado como huérfano o 5-HT₁-like) fue posterior y hasta 1997 no tuvo lugar el reconocimiento definitivo del 5-HT_{7R} como un verdadero subtipo dentro de la familia de receptores 5-HT.²⁰

El gen del 5-HT_{7R} está localizado en el cromosoma 10q21-q24 humano.^{21,22} Su estructura génica consta de un extremo carboxilo terminal moderadamente largo, un tercer bucle intracelular corto y dos intrones,²³ uno en el segundo bucle intracelular y otro en el extremo carboxilo terminal. Conviene mencionar que se han identificado cuatro isoformas del 5-HT_{7R}: 5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)}, 5-HT_{7(c)} y 5-HT_{7(d)}, lo que añade un nivel de complejidad adicional al estudio del receptor (Figura 3).²⁴ Tres de ellas se expresan en rata (r5-HT_{7(a)}, r5-HT_{7(b)} y r5-HT_{7(c)}) y otras tres en humano (h5-HT_{7(a)}, h5-HT_{7(b)} y h5-HT_{7(d)}). Las isoformas r5-HT_{7(a)} y r5-HT_{7(b)} presentan unas secuencias de aminoácidos semejantes a las correspondientes variantes en humano, por lo que pueden denominarse conjuntamente 5-HT_{7(a)} y 5-HT_{7(b)} sin necesidad de indicar la especie; sin embargo, la isoforma r5-HT_{7(c)} no es homóloga a la variante h5-HT_{7(d)}.

Como es característico de los GPCRs, todas las isoformas constan de un extremo carboxilo terminal intracelular, siete dominios transmembrana hidrofóbicos, conectados entre sí por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, y un extremo amino terminal extracelular susceptible de glicosilación. Las isoformas difieren únicamente en la secuencia y longitud del extremo carboxilo terminal citoplasmático. Las isoformas 5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)} y 5-HT_{7(c)} no presentan en su extremo carboxilo terminal sitios para una posible fosforilación, mientras que la variante 5-HT_{7(d)} tiene dos

sitios de fosforilación en dicho extremo, uno para la proteína quinasa C (PKC) y otro para la caseína quinasa II (CK2). Cada una de las isoformas parece constituir un receptor funcionalmente activo, siendo el 5-HT_{7(a)} el más abundante tanto en cerebro de rata

como en humano.²⁵⁻²⁸ El receptor h5-HT₇ (correspondiente a la isoforma 5-HT_{7(a)}) es un polipéptido de 445 aminoácidos (Figura 3) y cabe destacar su baja homología de secuencia, entre un 39 y 59%, con otros receptores 5-HT humanos.

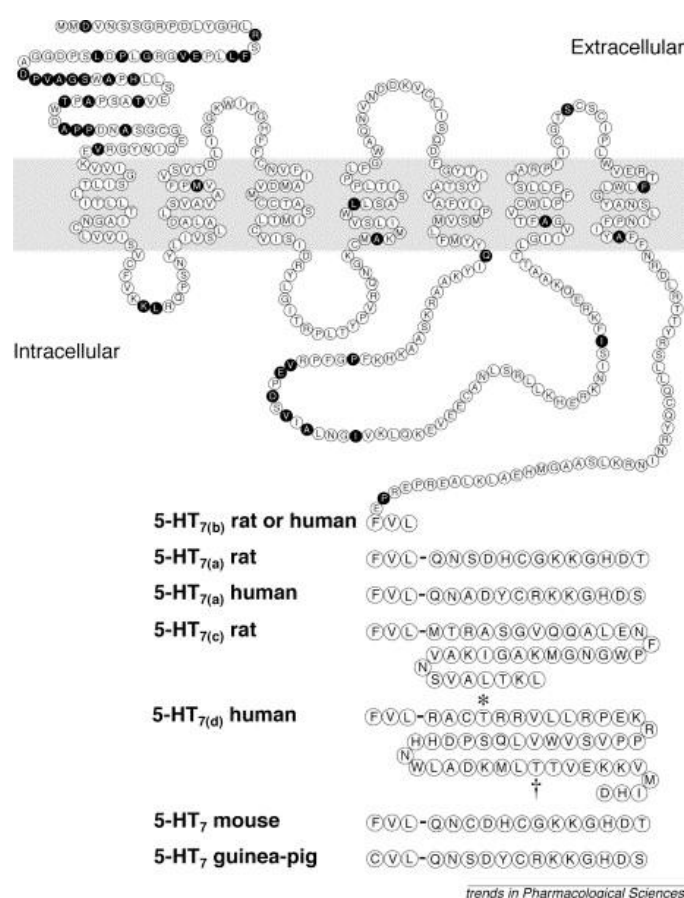


Figura 3. Secuencia de las isoformas del 5-HT₇R en diferentes especies (fuente: *Trends Pharmacol. Sci.* 2008, 21, 70-77).

En cuanto al mecanismo de transducción implicado en la activación del 5-HT₇R, se ha demostrado que su acoplamiento positivo a la adenilato ciclasa (AC) induce un aumento en la producción de AMP cíclico (AMPc).^{16-19,29-31} Al igual que otros receptores de 5-HT, el 5-HT₇R activa la cascada de la AC mediante el acoplamiento de los aminoácidos del tercer bucle intracelular a la subunidad G α_s .^{28,32}

La tardía identificación del 5-HT₇R nativo, así como la ausencia durante muchos años de un radioligando potente y selectivo, supuso que el estudio de su distribución en diversos tejidos se realizara inicialmente bien mediante ensayos de localización del ARNm,³³⁻³⁵ o de identificación de la proteína con radioligandos no selectivos como 5-carboxamidotriptamina (5-CT) tritiada (véase Figura

5).^{33,34,36,37} Estos estudios han revelado la presencia tanto del 5-HT₇R como del ARNm que codifica para esta proteína en el SNC, con niveles especialmente altos en el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo (sobre todo dentro del núcleo supraquiasmático, NSQ) y la corteza cerebral. En los tejidos periféricos, se ha localizado el 5-HT₇R en el íleon, el bazo, las glándulas endocrinas y las arterias. En los vasos sanguíneos y el tracto gastrointestinal, el receptor se expresa principalmente en las células del músculo liso.

El desarrollo en el año 2000 de SB-269970 tritiado (véase Figura 5), primer radioligando selectivo del 5-HT₇R, con alta afinidad y actividad antagonista, permitió confirmar la distribución regional de este receptor en todas las secciones de cerebro humanas descritas previamente (Figura 4).^{38,39} El uso tanto del antagonista selectivo SB-269970 en ensayos preclínicos como de ratones *knockout* (carentes del 5-HT₇R)⁴⁰⁻⁴⁵ en modelos animales de comportamiento han permitido estudiar las funciones fisiológicas del receptor, así como su posible implicación en procesos patológicos, del SNC fundamentalmente.

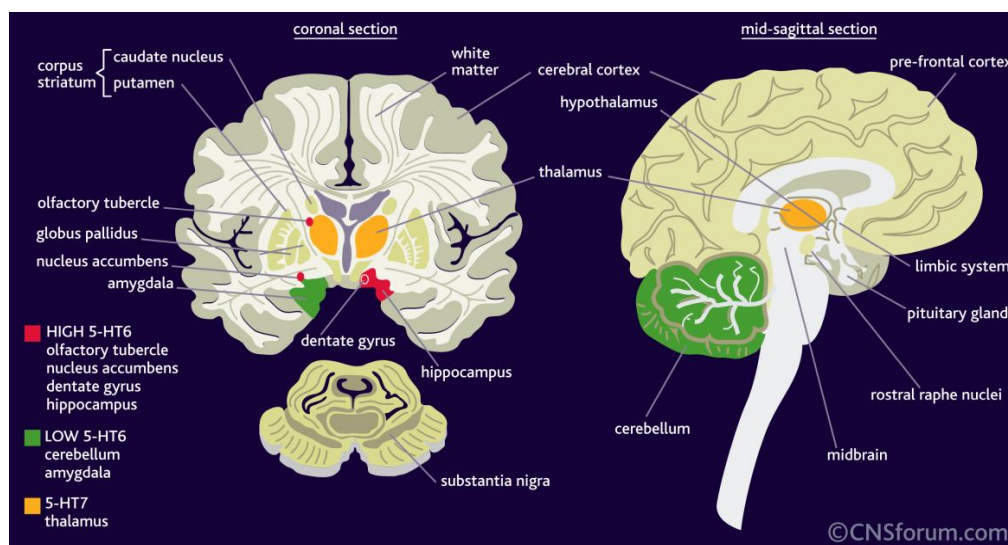


Figura 4. Distribución del 5-HT₇R en el cerebro humano (fuente: CNSforum).

En general, se ha encontrado una buena correlación entre la localización de 5-HT₇Rs y las funciones en las que están implicados.^{13-15,46} Así, la presencia del receptor en el hipotálamo pone de manifiesto su relación con los ritmos circadianos, la termorregulación y la regulación neuroendocrina. Los 5-HT₇Rs talámicos y corticales están asociados al sueño, la regulación del estado de ánimo y la epilepsia.

Los 5-HT₇Rs presentes en el hipocampo pueden ser de importancia en el aprendizaje y la memoria. Asimismo, la localización de estos receptores en la médula espinal es consistente con su demostrada implicación en el dolor y la locomoción. Por último, en la periferia, su presencia en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos ha sugerido un papel para este receptor en la migraña.

A.1.2. LIGANDOS 5-HT₇. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Claramente, los estudios que siguieron a la clonación del 5-HT₇R en la década de los 90 evidenciaron sus importantes funciones fisiológicas y su posible implicación en diversos procesos fisiopatológicos. Sin embargo, esta caracterización farmacológica inicial se llevó a cabo con ligandos no selectivos, lo que impidió asegurar que los efectos observados eran debidos al 5-HT₇R. En consecuencia, poco después de su descubrimiento, el nuevo receptor serotoninérgico se convirtió en una diana terapéutica muy atractiva para el descubrimiento de fármacos y en los últimos diez años se han dedicado grandes esfuerzos dirigidos a la identificación de nuevos ligandos 5-HT₇ potentes y selectivos. En este sentido, son muchas las compañías farmacéuticas que iniciaron programas de cribado de alta productividad (*high throughput screening*, HTS), identificándose *hits* de diferentes clases estructurales, cuya optimización posterior ha dado lugar a un buen número de ligandos, fundamentalmente antagonistas, altamente potentes y selectivos del 5-HT₇R.^{15,47-50}

A continuación, mencionaremos algunos de ellos, los cuales han sido sometidos a una amplia investigación preclínica que, junto con estudios realizados con ratones *knockout*,⁴⁰⁻⁴⁵ han permitido validar el interés del 5-HT₇R como diana terapéutica para diversas enfermedades del SNC, tales como la depresión, las alteraciones del sueño y el trastorno cognitivo, así como para el tratamiento de la migraña o del dolor.

El primer antagonista selectivo del 5-HT₇R descrito fue la sulfonamida SB-258719^{51,52} (Figura 5) identificada en 1998 mediante técnicas de HTS por la compañía farmacéutica SmithKline Beecham. Aunque SB-258719 mostró una afinidad moderada ($pK_i = 7,5$), presentó selectividad frente a un amplio espectro de receptores (serotoninérgicos, adrenérgicos y dopaminérgicos). Un año después Kikuchi et al.

identificaron, también mediante HTS, el tetrahydrobenzoindol DR4004 (Figura 5) como un antagonista del 5-HT₇R con elevada afinidad ($pK_i = 8,7$), aunque moderada selectividad frente a otros receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos.^{53,54} Los antagonistas SB-258719 y DR4004 fueron las primeras herramientas disponibles para elucidar el papel biológico de los 5-HT₇Rs en los sistemas nerviosos central y periférico y, en los años siguientes a su descubrimiento, ambos ligandos fueron utilizados como *hits* para obtener antagonistas 5-HT₇ más potentes y selectivos. Así, la optimización de SB-258719 mediante restricción conformacional de la cadena lateral dio lugar a los análogos SB-258741 y SB-269970 (Figura 5) con un incremento tanto en la afinidad ($pK_i = 8,5$ y $8,9$, respectivamente) como en la selectividad por el 5-HT₇R.^{55,56} En particular, SB-269970 fue tritado para ser empleado como radioligando en estudios de distribución de los 5-HT₇Rs y en la evaluación de la afinidad de nuevos ligandos por este receptor.³⁸ Sin embargo, el perfil farmacocinético de SB-269970 no permitía su uso en clínica. Los mismos autores llevaron a cabo un estudio de relación estructura-afinidad llegando a la identificación del análogo estructural SB-656104 (Figura 5), que mantenía una elevada afinidad ($pK_i = 8,7$) y selectividad por el 5-HT₇R y presentaba además unas mejores propiedades farmacocinéticas.⁵⁷

La búsqueda de agonistas selectivos del 5-HT₇R ha resultado menos fructífera, siendo AS-19, desarrollado por investigadores de la universidad de Uppsala en Suecia, el agonista 5-HT₇ de referencia ($K_i = 0,6$ nM).⁵⁸ Sin embargo, un estudio reciente mostró que este ligando presenta también afinidad moderada por el 5-HT_{1A}R.⁵⁹ En este sentido, los laboratorios Esteve han sido particularmente activos en la búsqueda de agonistas del 5-HT₇R más selectivos, algunos de los cuales han sido sometidos a ensayos preclínicos.⁶⁰⁻⁶²

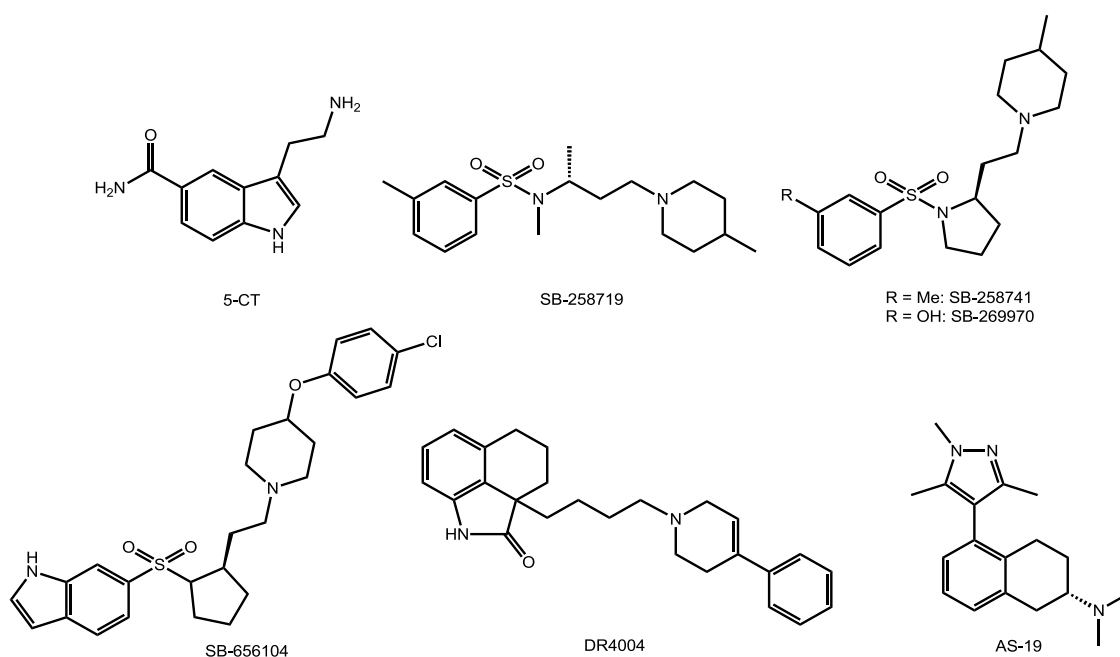


Figura 5. Agonistas y antagonistas de referencia del 5-HT₇R.

A.1.2.1. Depresión

Diversos antidepresivos, tanto tricíclicos como inhibidores de la recaptación de serotonina (IRSS), inducen la expresión del factor de transcripción *c-fos* de un modo consistente con la activación del 5-HT₇R en el NSQ.⁶³ Además, el tratamiento crónico con antidepresivos conlleva una reducción significativa tanto en la expresión de *c-fos*, como en la del 5-HT₇R.⁶³ Por tanto, la acción de los antidepresivos parece estar, al menos en parte, directamente mediada por el 5-HT₇R.^{63,64}

Los tests de natación forzada y de suspensión por la cola son dos de los modelos de comportamiento más comunes para evaluar el potencial antidepresivo de un fármaco o para determinar el fenotipo de animales *knockout* con respecto a la depresión.^{65,66} En estos dos modelos, la inhibición farmacológica del 5-HT₇R o la inactivación de su gen conlleva un perfil de comportamiento antidepresivo, es decir, de inmovilidad

reducida.^{41,67-72} Se ha demostrado que existe una interacción sinérgica entre dosis individuales no efectivas del antagonista SB-269970 y de diversos antidepresivos, tales como citalopram o imipramina, provocando una reducción de la inmovilidad en ambos modelos *in vivo* de depresión.^{67,68,71,72}

Por otro lado, un estudio reciente realizado con amisulprida ofrece una nueva perspectiva clínica para los antagonistas del 5-HT₇R en el tratamiento de la depresión. Amisulprida es un antipsicótico atípico aprobado para el tratamiento de la esquizofrenia en diversos países de Europa. Además, amisulprida ha demostrado su papel como antidepresivo en distintos ensayos clínicos en pacientes con depresión mayor.^{73,74} Tradicionalmente, el efecto antidepresivo de amisulprida se ha asociado a sus propiedades como antagonista dopaminérgico D₂/D₃, aunque el mecanismo nunca ha sido explicado satisfactoriamente. Posteriormente, se ha demostrado

que amisulprida presenta una elevada actividad antagonista por el 5-HT₇R, lo cual podría explicar su acción como antidepresivo *in vivo*. Además, reduce la inmovilidad en los modelos de suspensión por la cola y de natación forzada en ratones *wild-type* pero no en ratones *knockout*.⁷⁵ Estos interesantes resultados sugieren que el efecto antidepresivo de amisulprida puede estar mediado por el 5-HT₇R.

El mismo comportamiento en dichos modelos animales de depresión se ha observado para aripiprazol, también antipsicótico atípico con afinidad por el 5-HT₇R,^{75,76} que se utiliza para incrementar la eficacia de los antidepresivos en uso, tales como fluoxetina.^{72,77}

Existen, por tanto, evidencias claras, tanto farmacológicas como genéticas, que indican que el 5-HT₇R es una diana terapéutica para el tratamiento de la depresión.^{14,78-80} Sin embargo, hasta el momento, ningún antagonista de este receptor ha entrado en fase clínica como nuevo antidepresivo. De hecho, la existencia en el mercado de fármacos bien consolidados para el tratamiento de la depresión deja poco margen a la introducción de nuevos antidepresivos, que tendrían que presentar un perfil general significativamente mejor que el que poseen los fármacos en uso.

A.1.2.2. Alteraciones del sueño

Entre los síntomas clínicos de la depresión, se encuentran con frecuencia una desregulación de los ritmos circadianos y alteraciones del sueño.⁸¹ El principal reloj biológico circadiano en mamíferos se localiza en el NSQ del hipotálamo, donde el 5-HT₇R se encuentra altamente expresado.⁸² El ciclo circadiano tiene un período de aproximadamente 24 horas y debe ser ajustado cada día mediante la exposición al ciclo externo de luz-oscuridad, a través de la información luminosa proveniente de la retina. Otros estímulos no luminosos como fármacos, disponibilidad periódica de

comida, ejercicio voluntario, privación de sueño y hábitos sociales también pueden afectar a las diferentes fases del reloj biológico.

La implicación del 5-HT₇R en la regulación de la actividad eléctrica del NSQ ha quedado ampliamente demostrada. Así, su activación provoca cambios en diferentes fases de estos ciclos biológicos periódicos, tanto los mediados por estímulos luminosos como por los no luminosos.^{42,83-86} Además, estos cambios son inhibidos por los antagonistas 5-HT₇ SB-269970 y DR4004^{87,88} y no se observan en ratones *knockout*.⁸⁹

Por otro lado, la disminución de los 5-HT₇R en los núcleos del rafe con el envejecimiento, junto con el hecho de que éste produzca alteraciones en los ritmos circadianos, apoyan la implicación de estos receptores en la regulación del reloj biológico.⁸⁸

Debido al papel primordial del 5-HT₇R en el control de los ritmos circadianos, los antagonistas selectivos de este receptor podrían ser útiles en el tratamiento de las alteraciones del sueño debidas a los cambios de horario en los vuelos (*jet lag*) y otros trastornos de naturaleza circadiana como el insomnio, el síndrome de la fase de sueño retardada y el trastorno por ausencia del ciclo sueño-vigilia en 24 horas. Esta hipótesis está respaldada por estudios *in vivo* desarrollados tanto con los antagonistas 5-HT₇ SB-269970 y SB-656104, como con ratones *knockout*.^{67,90,91}

A.1.2.3. Trastorno cognitivo: memoria y aprendizaje

Debido a la elevada expresión del 5-HT₇R en el hipocampo, se ha investigado el posible papel de este receptor en relación con la memoria espacial empleando ratones *knockout*. Así, un análisis extenso utilizando el test del laberinto de Barnes reveló que los ratones carentes del 5-HT₇R tienen mayor dificultad que los ratones *wild-type* para asimilar cambios en la disposición espacial y tienen mermada la memoria requerida para resolver tareas espaciales.⁹² Además,

no se han encontrado diferencias en tareas de aprendizaje independientes del hipocampo: miedo condicionado (*cued fear conditioning*), alimentación condicionada (*operant food conditioning*) o aprendizaje motor.^{92,93} También se ha demostrado a favor del efecto pro-cognitivo del 5-HT₇R, que el agonista AS-19 potenció la adquisición de memoria y que este efecto pudo ser revertido por el antagonista 5-HT₇ SB-269970.⁹⁴

Por otro lado, los antagonistas 5-HT₇ selectivos SB-269970 y DR4004 han sido capaces de revertir la amnesia inducida por escopolamina en un test de condicionamiento Pavloviano.⁹⁵

Claramente, el disponer de nuevos ligandos potentes y selectivos del 5-HT₇R será determinante para poder esclarecer la implicación del 5-HT₇R en la memoria y el aprendizaje, y en último término en enfermedades que conlleven trastorno cognitivo, tales como el Alzheimer.⁹⁶

A.1.2.4. Migraña

La migraña es una alteración de alta incidencia en nuestros días y su efecto en la calidad de vida es significativo. Los fármacos habituales para los ataques de migraña consisten en terapias agudas para abortar un ataque, una vez que éste ha comenzado, más que para prevenirlo. En este sentido, el 15% de las personas que sufren migrañas podrían beneficiarse del tratamiento profiláctico; sin embargo, la disponibilidad de moléculas que prevengan los ataques de migraña de un modo efectivo y con un perfil de tolerancia aceptable es extremadamente limitada. Por tanto, el desarrollo de profilácticos para la migraña representa una necesidad clínica con un potencial comercial considerable.

Todavía no se comprenden bien las complejas alteraciones fisiológicas implicadas en la patogénesis de la migraña, si bien se ha sugerido la vasodilatación craneal como uno de los mecanismos que la originan. La capacidad de la 5-HT para inducir la dilatación de

los vasos sanguíneos craneales, junto con los cambios en los niveles de 5-HT observados durante los episodios de migraña, aseguran la implicación de este neurotransmisor en la enfermedad. Aunque probablemente estos efectos no están mediados por un solo subtipo de receptor serotoninérgico, existen pruebas claras que sugieren un papel para el 5-HT₇R.

Mientras no se disponía de antagonistas selectivos del 5-HT₇R, los perfiles farmacológicos permitieron proponer al receptor como el mediador de la vasodilatación inducida por serotonina en preparaciones de arterias del cerebro basilar y medio.⁹⁷ Posteriormente, se confirmó que esta vasodilatación podía ser bloqueada in vivo por el antagonista 5-HT₇ SB-269970.⁹⁸

La hipótesis de la posible implicación del 5-HT₇R en la patogénesis de la migraña es tan antigua como su clonación; sin embargo, la dificultad de obtener un modelo animal adecuado⁹⁹ es probablemente la principal causa de que a día de hoy continúe siendo sólo una de las más prometedoras perspectivas terapéuticas de sus antagonistas.

A.1.2.5. Dolor

Diversos estudios han investigado la posible implicación del 5-HT₇R en el dolor, en los diferentes niveles del sistema nervioso que intervienen en su complejo origen y tratamiento. Así, el antagonista SB-269970 ha demostrado su efecto analgésico in vivo frente al dolor periférico inducido por formalina o incluso por 5-CT.¹⁰⁰

Por otro lado, la evaluación in vivo de los efectos del agonista 5-HT₇ AS-19 en la hipersensibilidad inducida por capsaicina, un comportamiento de dolor a nivel del SNC, reveló que su administración sistémica ejerce un claro efecto analgésico dosis-dependiente que es inhibido por el antagonista 5-HT₇ SB-269970.^{15,61} En efecto, la compañía Esteve ha sido particularmente activa en la investigación de la

implicación del 5-HT₇R en el dolor. Sus trabajos han demostrado las propiedades analgésicas de los agonistas 5-HT₇, sugiriendo su utilidad terapéutica en el tratamiento del dolor neuropático.⁶⁰⁻⁶²

Por tanto, los datos disponibles hasta la fecha parecen revelar diferentes funciones para el 5-HT₇R en la mediación del dolor según su naturaleza sea a nivel periférico o central. Los estudios en curso permitirán con toda probabilidad esclarecer plenamente la relación entre este receptor serotoninérgico y el complejo proceso del dolor.

A.2. RESULTADOS PREVIOS Y OBJETIVOS

Los resultados obtenidos en los estudios preclínicos realizados fundamentalmente con el antagonista selectivo SB-269970 y con ratones *knockout* han confirmado la caracterización farmacológica inicial del 5-HT₇R y suponen la prueba de concepto para la posible aplicación terapéutica de sus ligandos. Esto ha estimulado en la última década una intensa búsqueda de antagonistas estructuralmente novedosos y de agonistas más selectivos, principalmente a cargo de diversas compañías farmacéuticas –Pfizer, Merck, Lilly, Esteve– como así lo demuestra el considerable número de patentes de ligandos 5-HT₇ registradas.^{49,50} Sin embargo, a pesar de la extensa investigación preclínica llevada a cabo, son muy escasos los ligandos 5-HT₇ que han sido sometidos a ensayos clínicos, por lo que en la actualidad sigue siendo un reto determinar si un ligando de este receptor serotoninérgico puede llegar a convertirse en un fármaco.

En este contexto, nuestro grupo de investigación inició hace algunos años un proyecto dirigido a la búsqueda racional de nuevos agentes del 5-HT₇R. Así, en una primera aproximación mediante la utilización del programa Catalyst,¹⁰¹ postulamos el primer modelo tridimensional (3D) de farmacóforo conocido para el reconocimiento de antagonistas por el receptor, que consiste en un centro ionizable (PI), un grupo aceptor

de enlace de hidrógeno (HBA) y tres regiones hidrofóbicas (HYD), a las distancias representadas en la Figura 6a.^{102,103} De la validación de este modelo mediante el diseño y síntesis de una nueva serie de naftolactamas y naftosultamas, surgió el *hit* UCM-5600 ($K_i = 89$ nM),¹⁰³ que representaba el punto de partida para el desarrollo de nuevos ligandos del 5-HT₇R (Figura 6b).

En el presente trabajo se pretende llevar a cabo, a partir del *hit* UCM-5600, el proceso *hit to lead* y optimización del *lead*, mediante el desarrollo de una nueva serie de compuestos de estructura general I. Asimismo, debido a que la mayoría de los ligandos del 5-HT₇R descritos exhiben afinidad por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (5-HT_{1AR}), se estudiará la selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A} en esta familia de ligandos.

La consecución de este objetivo se abordará a través de las siguientes etapas:

1. Síntesis de los compuestos de estructura general I (*hit to lead*).
2. Determinación del perfil de afinidad por el 5-HT₇R, selectividad frente al 5-HT_{1AR} y caracterización funcional (*hit to lead*).
3. Optimización del *lead* (síntesis, perfil de afinidad, caracterización funcional y propiedades farmacocinéticas).
4. Actividad farmacológica.

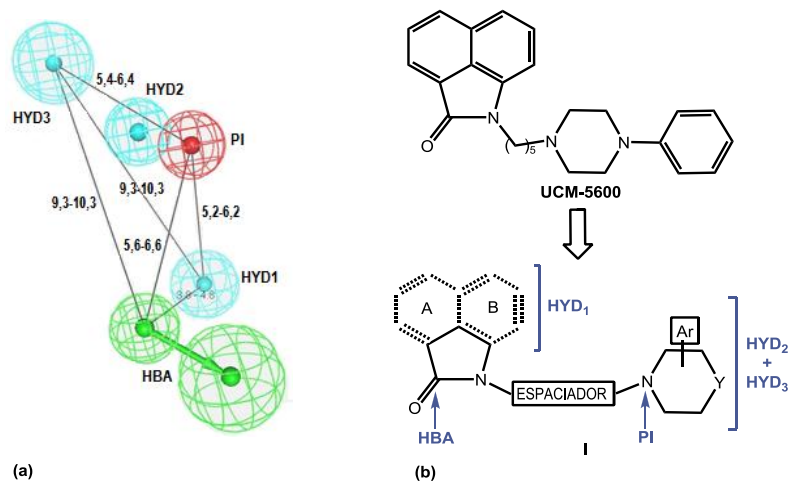
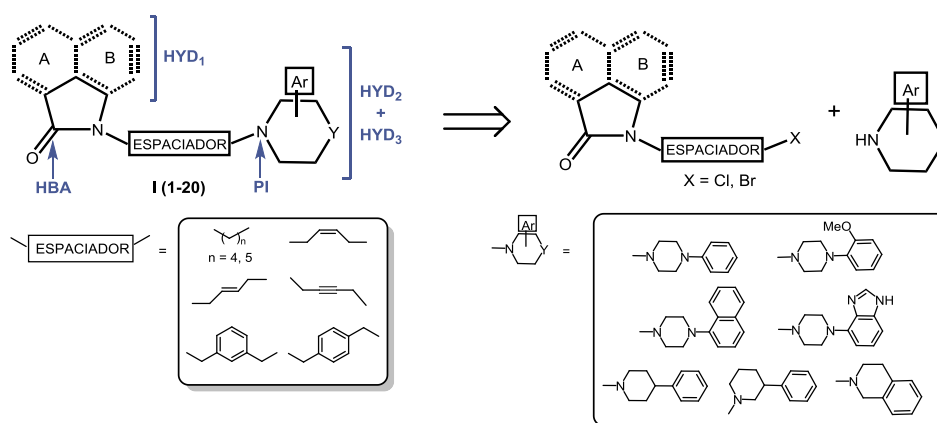


Figura 6. (a) Modelo 3D de farmacóforo postulado para antagonistas 5-HT₇. (b) Estructura del *hit* UCM-5600 y de los compuestos diseñados de fórmula I.

A.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A.3.1. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS I (1-20) (HIT TO LEAD)

De acuerdo con el primer objetivo propuesto en el presente trabajo, se planteó la síntesis de los nuevos compuestos de estructura general I, en los que a partir del *hit* UCM-5600 se han considerado las modificaciones estructurales representadas en el Esquema 1. Así, se ha sustituido el anillo de naftolactama (anillo AB) por los sistemas de isoindolin-1-ona (anillo A) ó 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (anillo B) como subunidades HYD₁ y HBA;



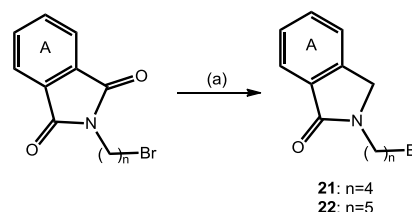
Esquema 1

Las 2-(ω-bromoalquil)isoindolin-1-onas **21**¹⁰⁴ y **22**, cuyo sistema aromático contiene el anillo A, se han obtenido por reducción de las 1-(ω-bromoalquil)ftalimidas con estaño en ácidos bromhídrico y acético (Esquema 2).

La síntesis de los derivados halogenados **23-29**,¹⁰⁵ que incluyen el anillo B en el sistema aromático, se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento general representado en el Esquema 3, por alquilación de 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona con el derivado dihalogenado adecuado en presencia de carbonato potásico (**23-27**) o carbonato de cesio (**28, 29**) como base (Esquema 3).

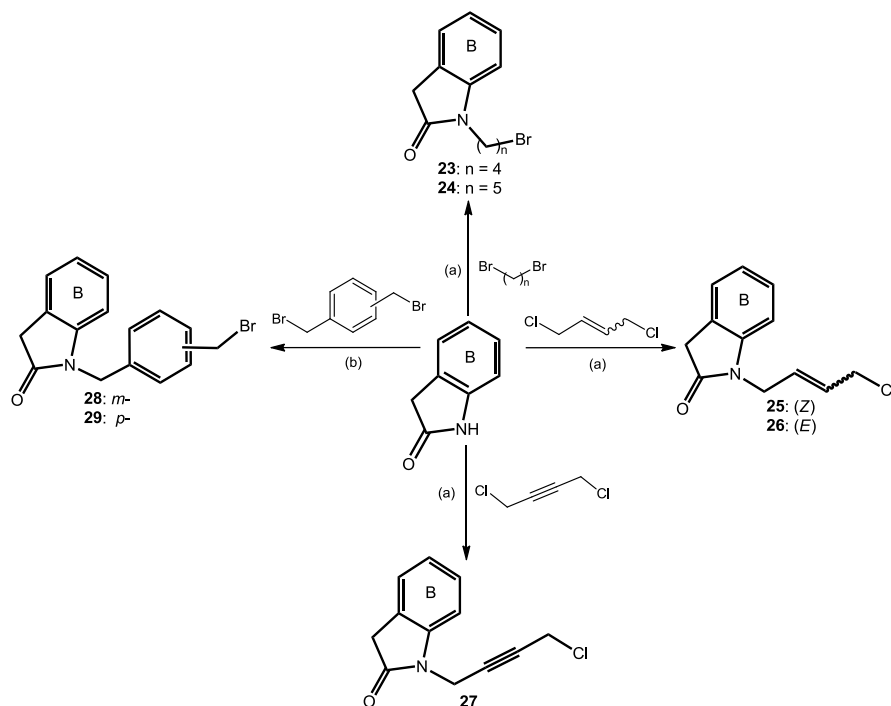
se han contemplado diferentes piperazinas, piperidinas o dihidroisoquinolinas como subunidades HYD₂ y HYD₃; y como espaciadores se han introducido cadenas alifáticas que contienen diferente número de grupos metilénicos, insaturaciones (doble enlace *cis* o *trans*, triple enlace), o bien un anillo aromático.

Para abordar la obtención de los compuestos finales **1-20** se planteó la ruta sintética general representada en el Esquema 1. Así, en primer lugar se procedió a la preparación tanto de los derivados halogenados intermedios como de las aminas no comerciales, para su posterior alquilación.



Reactivos: (a) Sn, AcOH, HBr, reflujo, 6 h, 25-30%.

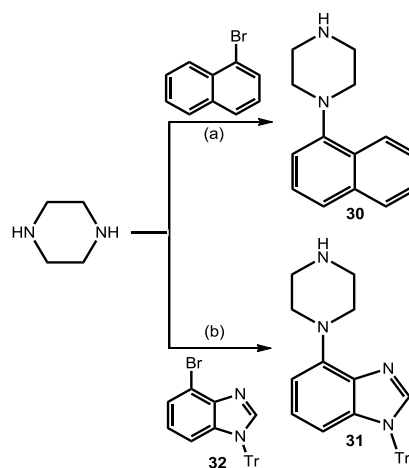
Esquema 2



Reactivos: (a) K_2CO_3 , acetonitrilo, reflujo, 3-20 h, 20-40%. (b) Cs_2CO_3 , acetonitrilo, reflujo, 3-5 h, 20%.

Esquema 3

1-(1-Naftil)piperazina (**30**) y 1-(1-tritil-4-bencimidazolil)piperazina (**31**) se han sintetizado siguiendo el método descrito previamente en nuestro grupo de trabajo, basado en la reacción de aminación de Buchwald-Hartwig de haluro de arilo en medio básico, catalizada por especies de paladio (0) estabilizadas con fosfinas como ligandos coordinantes.¹⁰⁶ Así, el acoplamiento de 1-bromonaftaleno ó 4-bromobencimidazol, convenientemente protegido, con piperazina se ha llevado a cabo empleando (\pm)-2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo (BINAP) como ligando coordinante, *tert*-butóxido sódico como base y tolueno seco como disolvente de la reacción; los catalizadores utilizados fueron acetato de paladio y el complejo de cloroformo de tris(dibencilidenacetona)dipaladio ($\text{Pd}_2\text{dba}_3\cdot\text{CHCl}_3$), respectivamente (Esquema 4).

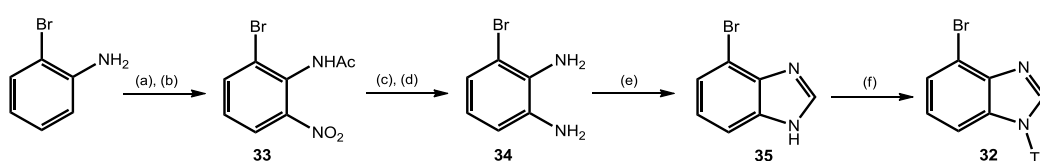


Reactivos: (a) $\text{Pd}(\text{AcO})_2$, BINAP, NaOtBu , tolueno, 80 °C, 3 h, 70%.
(b) $\text{Pd}_2\text{dba}_3\cdot\text{CHCl}_3$, BINAP, NaOtBu , tolueno, reflujo, 1,5 h, 60%.

Esquema 4

La síntesis de 4-bromo-1-tritilbencimidazol **32** se llevó a cabo a partir de 2-bromoanilina por una secuencia conocida¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ que implica acetilación del grupo amino, nitración del anillo, desacetilación, reducción, ciclación de Phillips con ácido fórmico y

protección del nitrógeno bencimidazólico (Esquema 5). Aunque en principio parece una secuencia larga y el paso de nitración no es selectivo (1:1, de los isómeros 1,2,4 y 1,2,6), esta ruta permite acceder de forma eficaz a grandes cantidades del derivado de bencimidazol **32**.



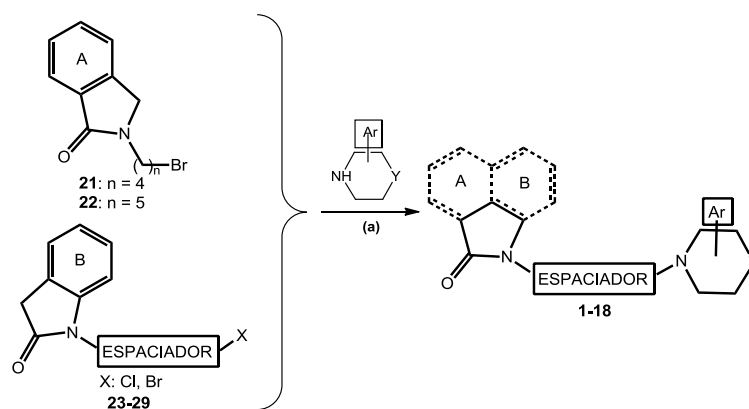
Reactivos: (a) Ac_2O , H_2SO_4 , t.a., 90%. (b) HNO_3 , AcOH , 0 °C, 24 h, 40%. (c) HCl , EtOH , reflujo, 5 h, 80%. (d) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl , t.a., 3 h, 90%. (e) HCOOH , H_2O , reflujo, 3 h, 80%. (f) TrCl , NaH , tetrahidrofurano, reflujo, 5 h, 80%.

Esquema 5

Los compuestos deseados **1-18** (Tabla 1) se han sintetizado por alquilación de las aminas adecuadas – 1-fenilpiperazina, 1-(2-metoxifenil)piperazina, 3-fenilpiperidina, 4-fenilpiperidina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1-(1-naftil)piperazina (**30**) y 1-(1-tritil-4-bencimidazolil)piperazina (**31**)– con los derivados halogenados **21-29** en presencia de acetonitrilo y trietilamina (Esquema 6). Para la obtención del derivado **10** fue necesaria la eliminación posterior del grupo tritilo del bencimidazol, por tratamiento con ácido acético, tetrahidrofurano y

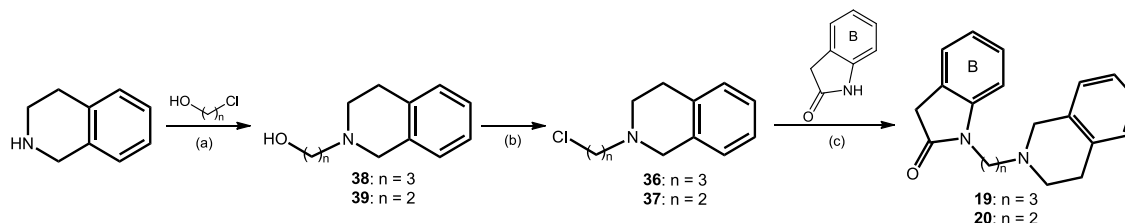
agua. En el caso de los compuestos finales **19** y **20**, la reacción de alquilación se realizó entre 1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona y las correspondientes 2-(ω -cloroalquil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas **36** y **37**, preparadas por tratamiento de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina comercial con 3-cloropropanol ó 2-cloroetanol, seguido de cloruro de tionilo (Esquema 7).¹¹⁰

Todos los compuestos finales sintetizados se transforman en su clorhidrato para su análisis elemental cuantitativo y las medidas biológicas.



Reactivos: (a) Et_3N , acetonitrilo, 60 °C, 24 h, 15-98%.

Esquema 6



Reactivos: (a) 100 °C, 16 h, 31-52%. (b) SOCl₂, dicloroetano, reflujo, 1,5 h, 62-75%. (c) K₂CO₃, KI, acetonitrilo, 60 °C, 16 h, 44-55%.

Esquema 7

A.3.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AFINIDAD POR EL 5-HT₇R, SELECTIVIDAD FRENTE AL 5-HT_{1A}R Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL (*HIT TO LEAD*)

Los estudios bioquímicos de determinación de la afinidad de los compuestos **1-20** sintetizados por los receptores serotoninérgicos 5-HT₇ y 5-HT_{1A} se han realizado mediante experimentos de desplazamiento de radioligando in vitro, en células CHO-K1 y HEK-293, transfectadas con el receptor 5-HT humano correspondiente.

Los ensayos de inhibición competitiva han consistido en incubar la preparación subcelular con el ligando tritiado selectivo del receptor de interés y con el compuesto objeto de estudio, con el fin de medir la capacidad de éste para desplazar al radioligando en su unión al receptor. Este desplazamiento se expresa mediante el porcentaje de unión específica del compuesto analizado respecto de la unión del radioligando. La unión específica de los compuestos se calcula por diferencia entre la unión total y la unión inespecífica determinada en presencia de un ligando conocido del receptor de interés (véase apartado A.4.2). En todos los casos la incubación se ha finalizado por filtración y la radiactividad unida a las membranas se ha cuantificado mediante espectrometría de centelleo líquido. En el caso de compuestos cuyo desplazamiento a la concentración de 1 µM es mayor del 55%, se ha determinado su concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀), mediante regresión no lineal de la curva de desplazamiento

obtenida para seis concentraciones diferentes del compuesto, utilizando el programa Prism (GraphPad). El cálculo de la constante de afinidad K_i se ha realizado a partir de la CI₅₀, según la ecuación de Cheng y Prusoff: $K_i = \text{CI}_{50} / (1 + L/K_D)$, donde L es la concentración de radioligando y K_D su constante de disociación.¹¹¹

En la Tabla 1 se recogen los datos de afinidad de los compuestos sintetizados **1 (1-20)** por los receptores estudiados. Los valores de K_i (nM) obtenidos corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

A continuación, se discuten las relaciones estructura-afinidad que pueden ser inferidas de los datos obtenidos y las variaciones estructurales consideradas para cada uno de los elementos farmacofóricos presentes en la molécula (Tabla 1).

(a) En la región HYD₁, la subunidad de isoindolin-1-ona (anillo A) es menos favorable que el sistema de 1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (anillo B) para la afinidad por el 5-HT₇R. Así, los compuestos **1-3** [$K_i(\mathbf{1}) > 1000$ nM, $K_i(\mathbf{2}) = 158$ nM, $K_i(\mathbf{3}) = 203$ nM)] exhiben una afinidad notablemente inferior a la de sus análogos **4, 5 y 7** [$K_i(\mathbf{4}) = 74$ nM, $K_i(\mathbf{5}) = 32$ nM, $K_i(\mathbf{7}) = 63$ nM)], respectivamente.

(b) De acuerdo con la distancia óptima (5,2-6,2 Å) entre la región HYD₁ y el centro básico PI propuesta en nuestro modelo de farmacóforo (véase Figura 6), se observa que es necesaria la presencia de un

espaciador de al menos cuatro unidades metilénicas para conseguir una alta afinidad 5-HT₇. En este sentido, la afinidad decrece considerablemente al ir disminuyendo progresivamente el número de unidades metilénicas de cuatro en el ligando **18** a tres y dos en los compuestos **19** y **20** [$K_i(\mathbf{19}) = 105$ nM, $K_i(\mathbf{20}) = 350$ nM vs $K_i(\mathbf{18}) = 7$ nM]. Sin embargo, estos ligandos no presentan afinidad por el 5-HT_{1A}R ($K_i > 1000$ nM). También se ha observado que una cadena alquílica saturada es más favorable para la unión al 5-HT₇R. Así, los derivados insaturados **11**, **13-15** son inactivos o exhiben baja afinidad [$K_i(\mathbf{11}) = 250$ nM, $K_i(\mathbf{13-15}) > 1000$ nM], a diferencia de los análogos saturados **6** y **9** [$K_i(\mathbf{6}) = 47$ nM, $K_i(\mathbf{9}) = 69$ nM]. Únicamente el compuesto **12**, con un doble enlace *trans* en el espaciador, conserva la afinidad 5-HT₇ [$K_i(\mathbf{12}) = 69$ nM].

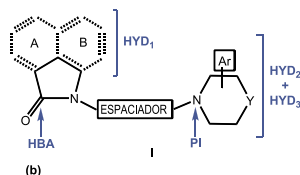
(c) Las regiones farmacofóricas HYD₂-HYD₃ parecen jugar un papel importante en la selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A}. En general, los compuestos que contienen un anillo de benceno o benceno sustituido como subunidad Ar muestran afinidad por el 5-HT₇R, siendo inactivos en el 5-HT_{1A}R, mientras que los compuestos con sistemas aromáticos de naftaleno o bencimidazol exhiben afinidad por ambos receptores. Así por ejemplo, los derivados **7** y **8** (Ar = fenilo, 2-metoxifenilo) son selectivos del 5-HT₇R ($K_i = 63$ nM; 5-HT_{1A}R: $K_i > 1000$ nM) y los análogos **9** y **10** (Ar = 1-naftilo, 4-bencimidazolilo) se unen a ambos receptores (5-HT₇R: $K_i = 69$ y 68 nM; 5-HT_{1A}R: $K_i = 16$ y $18,1$ nM, respectivamente).

Dentro de la serie de compuestos sintetizados **1-20** (Tabla 1) en el proceso de *hit to lead*, cabe destacar el derivado **18** que exhibe la mayor afinidad 5-HT₇ ($K_i = 7$ nM) y la mejor ratio de selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A} (31

veces). Así, el *lead* **18** se seleccionó para la evaluación de su actividad funcional en el 5-HT₇R. Ésta se determinó midiendo el efecto de los compuestos sobre la actividad de la AC en células CHO transfectadas con el 5-HT₇R humano, el cual está acoplado positivamente a la cascada de dicha enzima. El experimento consiste en incubar las células con el compuesto objeto de estudio, en ausencia (efecto agonista) o presencia (efecto antagonista) de serotonina, y determinar la concentración de AMPc por espectroscopía de fluorescencia de tiempo resuelto (*homogeneous time-resolved fluorescence*, HTRF). La actividad de la AC se expresa como el porcentaje del efecto máximo obtenido con serotonina.

El compuesto **18** indujo un incremento dosis-dependiente de los niveles de AMPc, si bien el efecto máximo de activación fue del $40 \pm 1\%$ (Figura 7). La concentración de compuesto que produce la mitad de dicho efecto, concentración efectiva 50 (CE₅₀), calculada mediante regresión no lineal de la curva obtenida para seis concentraciones diferentes de compuesto, fue de $0,31 \pm 0,04$ μ M. Tras el pretratamiento con serotonina, el ligando **18** indujo una disminución dosis-dependiente de la concentración de AMPc (Figura 8). El valor de la CI₅₀ fue superior a la concentración más alta ensayada de 10 μ M, y el efecto inhibitorio máximo fue del $43 \pm 4\%$. Como agonista y antagonista de referencia se emplearon serotonina (CE₅₀ = 15 nM) y mesulergina (CI₅₀ = 120 nM), respectivamente.

Estos resultados indican que el compuesto **18** (UCM-3307) se comporta como un agonista parcial del h5-HT₇R, por lo que fue seleccionado como *lead* para su optimización en la búsqueda de nuevos antagonistas potentes del 5-HT₇R.

Tabla 1. Afinidades de los compuestos **1** (**1-20**) por los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A}, in vitro.¹¹²

Compuesto	Anillo	Espaciador	Y	Ar ^a	K _i ± E.E. (nM) ^b	
					5-HT ₇	5-HT _{1A}
1	A		N	fenilo	> 1000	360 ± 9
2	A		N	2-metoxifenilo	158 ± 18	> 1000
3	A		N	fenilo	203 ± 24	> 1000
4	B		N	fenilo	74 ± 9	124 ± 12
5	B		N	2-metoxifenilo	32 ± 4	> 1000
6	B		N	1-naftilo	47 ± 6	22 ± 2
7	B		N	fenilo	63 ± 8	> 1000
8	B		N	2-metoxifenilo	63 ± 7	> 1000
9	B		N	1-naftilo	69 ± 2	16 ± 1
10	B		N	4-bencimidazolilo	68 ± 8	18,1 ± 0,4
11	B		N	1-naftilo	250 ± 19	11,5 ± 0,3
12	B		N	1-naftilo	69 ± 7	39 ± 4
13	B		N	1-naftilo	> 1000	26 ± 2
14	B		N	1-naftilo	> 1000	> 1000
15	B		N	1-naftilo	> 1000	181 ± 7
16	B		CH	fenilo	160 ± 15	> 1000
17	B		CH ₂	fenilo	193 ± 13	> 1000
18 (UCM-3307)	B		3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-ilo		7 ± 2	219 ± 11
19	B		3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-ilo		105 ± 12	> 1000
20	B		3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-ilo		350 ± 25	> 1000
UCM-5600	AB		N	fenilo	89 ± 5	92% ^c

^aTodos los grupos Ar están en la posición 4 del anillo, excepto en el compuesto **17**, sustituido en la posición 3. ^bLos valores obtenidos corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

^cDesplazamiento del radioligando a la concentración de 1 μM.

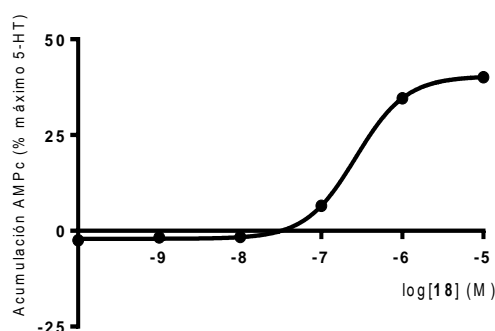


Figura 7. Efecto agonista del ligando **18** (UCM-3307) en el h5-HT₇R.

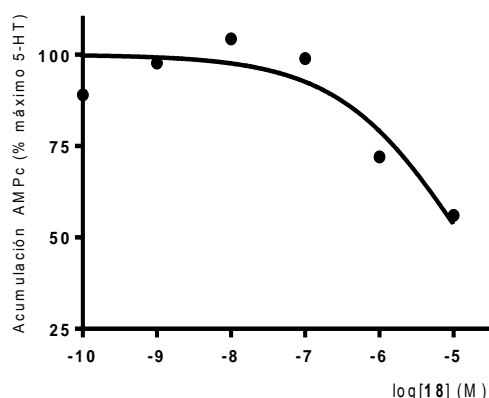


Figura 8. Efecto antagonista del ligando **18** (UCM-3307) en el h5-HT₇R.

A.3.3. OPTIMIZACIÓN DEL LEAD

Con el fin de profundizar en el entendimiento de las relaciones estructura-afinidad y -selectividad en los compuestos de fórmula **I** que nos pueda ayudar en la optimización del *lead* **18** (UCM-3307), se han llevado a cabo simulaciones computacionales de los complejos ligando-receptor. Estos modelos nos han permitido estudiar el detalle molecular de las interacciones que en el reconocimiento ligando-receptor son importantes para la afinidad y selectividad por los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A}.

Los modelos 3D de las hélices transmembrana (TMs) de ambos receptores se han construido por homología mediante técnicas de modelización molecular asistida por ordenador, a partir de la estructura de rayos X elucidada para el receptor β_2 -adrenérgico humano (archivo 2RH1 de la base de datos de proteínas PDB de Brookhaven)^{113,114} y siguiendo la metodología empleada anteriormente en nuestro grupo de investigación.¹¹⁵ En este sentido, es importante resaltar la notable contribución de la resolución en los últimos cinco años de las estructuras cristalográficas de diversos complejos ligando-receptor para GPCRs de la familia de las aminas biogénicas.¹¹⁶⁻¹²²

En las Figuras 9a y 9b se representan los modelos computacionales obtenidos para la interacción del ligando **6** con los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A}, respectivamente. En el complejo del compuesto **6** con el 5-HT₇R (Figura 9a) el anillo aromático B (HYD₁) se aloja en una pequeña cavidad entre las TMs 5 y 6 interactuando con las cadenas laterales aromáticas de los residuos de F5.47 y F6.52; el grupo carbonilo (HBA) se une mediante un enlace de hidrógeno con la S6.55; la amina protonada (PI) forma una interacción iónica con el D3.32; y el anillo de naftaleno (HYD₂-HYD₃) se expande hacia las TMs 2 y 3 interactuando con la F3.28. Sin embargo, en el complejo del compuesto **6** con el 5-HT_{1A}R (Figura 9b), el modo de unión propuesto es distinto. El grupo carbonilo (HBA) forma un enlace de hidrógeno con la S5.42 del 5-HT_{1A}R y no interactúa con la S6.55, como lo hace en su unión al 5-HT₇R. En la Figura 10 se representan las secuencias de aminoácidos de las TMs 2, 3, 5-7 de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇. La ausencia de la S6.55 en el 5-HT_{1A}R, que contiene un residuo de Ala en esa posición, explica la interacción del compuesto **6** con la S5.42. Cabe mencionar que el entorno de la TM 5 es idéntico en ambos receptores, que contienen los aminoácidos S5.42, T5.43 y A5.46, así como un residuo voluminoso de V3.33 en la TM 3, que apunta hacia la TM 5, definiendo el sitio de unión. Por tanto, el compuesto **6** podría también unirse al 5-HT₇R de un modo similar al que presenta en su unión con el 5-HT_{1A}R, es decir, a través de la S5.42.

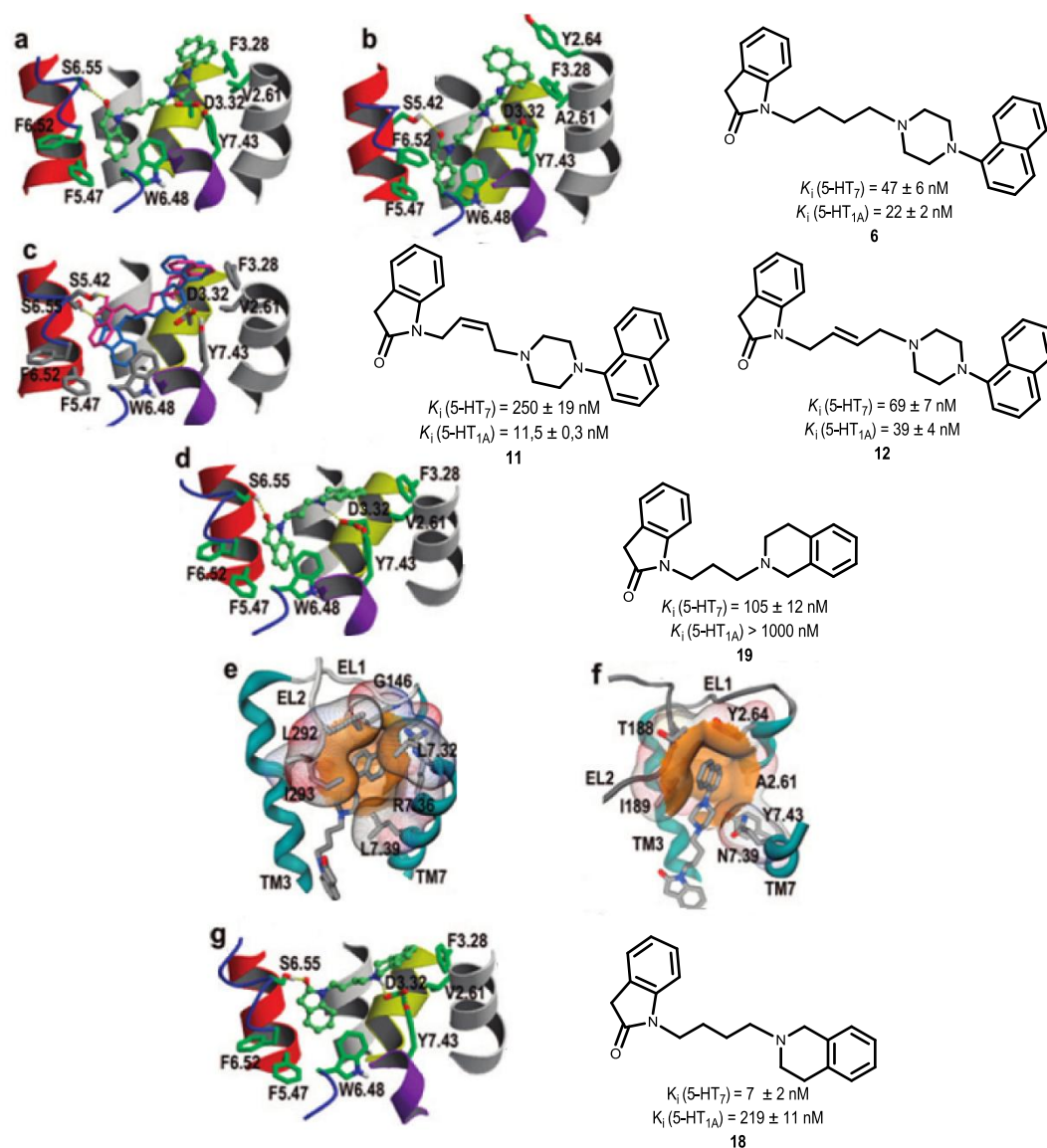


Figura 9. (a, b) Modelos computacionales de los complejos entre el compuesto **6** y (a) el 5-HT₇R y (b) el 5-HT_{1A}R, construidos a partir de la estructura cristalográfica del receptor β₂-adrenérgico. La amina protonada del compuesto **6** forma una interacción iónica con el D3.32; el anillo B, localizado en una pequeña cavidad entre las TMs 5 y 6, presenta interacciones de tipo aromático con las cadenas laterales de F5.47 y F6.52; el grupo carbonilo establece enlace de hidrógeno con la S6.55 en el 5-HT₇R y con la S5.42 en el 5-HT_{1A}R; y el anillo aromático de naftaleno interacciona con la F3.28 en el 5-HT₇R y con la F3.28 y la Y2.64 en el 5-HT_{1A}R. (c) Modelos moleculares de los complejos entre los compuestos insaturados **11**, con un doble enlace *cis* en su espaciador (magenta); y **12**, con doble enlace *trans* (azul), y el 5-HT₇R. (d) Modelo molecular del complejo entre el compuesto **19**, con tres unidades metilénicas en el espaciador, y el 5-HT₇R. (e, f) La cavidad de unión entre las TMs 2, 3 y 7 y los ELs 1 y 2, de menor tamaño en el (e) 5-HT₇R que en el (f) 5-HT_{1A}R. (g) Modelo computacional del complejo entre el compuesto **18**, con un sistema aromático benzofusionado, y el 5-HT₇R. Se muestran los trazos de C_α de las TMs 2 (gris), 3 (amarillo), 4 (gris), 5 (rojo), 6 (azul) y 7 (violeta).

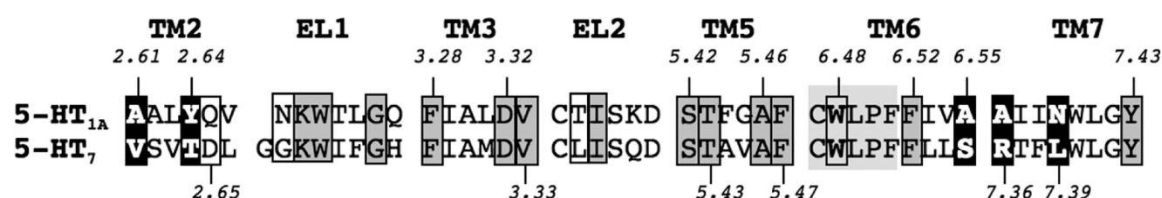


Figura 10. Secuencia de aminoácidos de las TMs 2, 3 y 5-7 y los ELs 1 y 2 y el 5-HT₇R. Los residuos a los que el texto hace referencia, se encuentran recuadrados. Los *hot-spots*, residuos con una importante contribución a la unión selectiva de los ligandos a sus receptores, están indicados en negro; los residuos idénticos en gris oscuro; y los residuos diferentes en blanco. El motivo CWxPF en la TM 6, altamente conservado, se muestra en gris claro.

Con el fin de validar experimentalmente los diferentes modos propuestos para la unión del ligando **6** a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇, se realizaron los modelos de interacción entre el 5-HT₇R y los análogos **11**, **12** y **13**, cuyos espaciadores están conformacionalmente restringidos. El derivado **12**, con un doble enlace *trans* en el espaciador (Figura 9c, compuesto azul) se superpone con la conformación propuesta para el compuesto **6** en su unión al 5-HT₇R, es decir, interaccionando con la S6.55. Así, ambos ligandos muestran una afinidad similar por el 5-HT₇R [$K_i(\mathbf{6}) = 47$ nM vs $K_i(\mathbf{12}) = 69$ nM]. En el caso del compuesto **11**, con doble enlace *cis* (Figura 9c, compuesto magenta), su interacción con el 5-HT₇R es más favorable a través de la S5.42, lo que explicaría su menor afinidad por el 5-HT₇R [$K_i(\mathbf{6}) = 47$ nM vs $K_i(\mathbf{11}) = 250$ nM]. Asimismo, en el compuesto insaturado **13**, el enlace triple dirige el grupo carbonilo (HBA) hacia la S5.42 (resultados no mostrados), por lo que el ligando se muestra inactivo en el 5-HT₇R ($K_i > 1000$ nM).

Por otro lado, la disminución de la longitud del espaciador resulta desfavorable para la interacción del compuesto **19**, con tres unidades metilénicas, con la S6.55 (Figura 9d), llegando a impedirla en el caso del análogo **20**, de dos unidades metilénicas. En efecto, el compuesto **19** conserva una afinidad moderada por el 5-HT₇R ($K_i = 105$ nM), mientras que **20** es prácticamente inactivo ($K_i = 350$ nM).

Estos resultados indican que la S6.55 constituye un *hot spot*, es decir, un residuo cuya contribución es clave en la afinidad de esta familia de ligandos por el 5-HT₇R y su selectividad frente al 5-HT_{1A}R.

Otro *hot spot* en la selectividad de los ligandos del 5-HT₇R frente al 5-HT_{1A}R se localiza entre las TMs 2 y 7 y los dominios extracelulares (ELs) 1 y 2. El 5-HT₇R posee, frente al D3.32, los residuos voluminosos de V2.61 y L7.39, en las posiciones en que el 5-HT_{1A}R presenta Ala y Asn, respectivamente (Figura 10), definiendo así el tamaño del sitio de unión entre las TMs 2 y 7 (Figuras 9e y 9f). En el EL1, el 5-HT₇R posee el residuo voluminoso de L232 en lugar de la T188 del 5-HT_{1A}R (Figura 10). Además, cerca de esta cavidad de reconocimiento, en el 5-HT₇R el D2.65 interacciona con la R7.36, ausente en el 5-HT_{1A}R, lo que le confiere una rigidez adicional a este bolsillo hidrofóbico en el 5-HT₇R. Por tanto, la cavidad situada entre las TMs 2, 3 y 7 para acomodar el ligando es más pequeña en el 5-HT₇R que en el 5-HT_{1A}R (Figuras 9e y 9f). De este modo, cabe esperar que cuanto menor sea el tamaño de la subunidad hidrofóbica del ligando alojada en la pequeña cavidad del 5-HT₇R, mayor afinidad presentará el ligando por este receptor.

En este sentido, el compuesto **18** ($K_i = 7$ nM), con un sistema aromático benzofusionado en las regiones HYD₂-HYD₃, es el ligando que exhibe una mayor afinidad por el 5-HT₇R dentro de la serie. En el modelo de interacción del compuesto **18** con el 5-HT₇R (Figura 9g), el anillo de tetrahidroisoquinolina se encuentra

alojado de manera óptima en esta cavidad, interaccionando con la F3.28 y sin interferir con la V2.61.

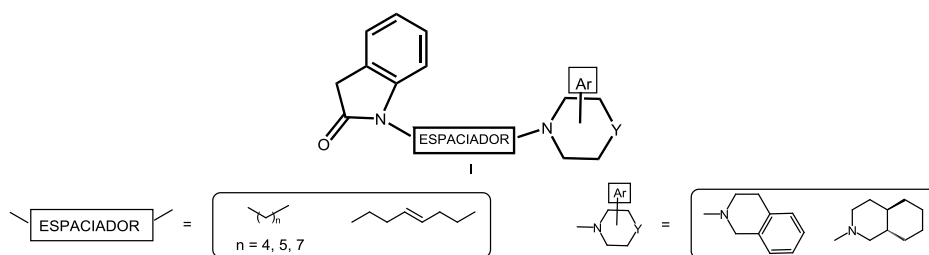
El 5-HT_{1A}R, además de poseer una cavidad mayor, incorpora un resto de Y2.64, orientado hacia esta cavidad de unión, que es Thr en el 5-HT₇R (Figura 10). Este residuo aromático de Y2.64 en el 5-HT_{1A}R interacciona de forma óptima con el anillo de naftaleno del compuesto **6** (Figura 9f). La ausencia de estas interacciones aromáticas de la Y2.64 con los anillos de benceno y tetrahydroisoquinolina explica que los compuestos **5**, **7**, **8**, **16-20** sean inactivos en el 5-HT_{1A}R, mientras que los compuestos con sistemas de naftaleno o bencimidazol como subunidad HYD₃ (**6**, **9**, **10** y **12**) muestren afinidad por ambos receptores.

La información proporcionada en este estudio nos permite proponer una hipótesis sobre las bases moleculares de la selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A}. Así, el espaciador entre los elementos farmacofóricos PI y HBA debe proporcionar una distancia y conformación adecuadas para favorecer la interacción del grupo

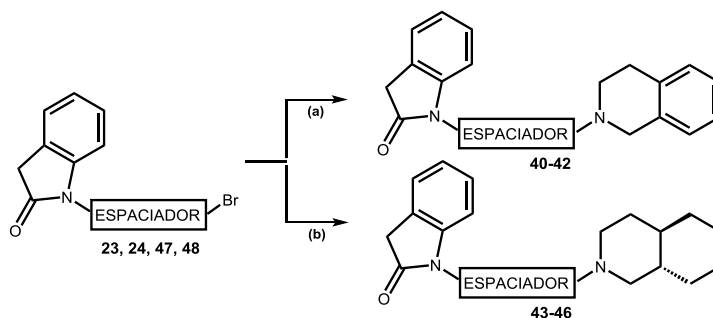
carbonilo del ligando con la S6.55, presente solamente en el 5-HT₇R, frente a la S5.42, que se encuentra también en el 5-HT_{1A}R. Por otro lado, un incremento en el tamaño de las regiones HYD₂-HYD₃ interfiere con el residuo voluminoso de V2.61 en el 5-HT₇R y favorece la interacción hidrofóbica con la Y2.64 en el 5-HT_{1A}R, disminuyendo la selectividad deseada.

Teniendo en cuenta estos requisitos estructurales, se abordó la obtención de *leads* optimizados, para lo cual se diseñaron nuevos compuestos de estructura general **I** (Esquema 8), en los que tanto el espaciador de cuatro a siete unidades metilénicas, como el pequeño tamaño de los sistemas de isoquinolina deberían favorecer una elevada afinidad 5-HT₇ a la vez que una buena selectividad frente al 5-HT_{1A}R.

La síntesis de los nuevos compuestos diseñados **40-46** (Esquema 9) se llevó a cabo por alquilación de 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina o (±)-*trans*-decahydroisoquinolina con los derivados halogenados **23**, **24**, **47** ó **48** (Esquemas 3 y 10).

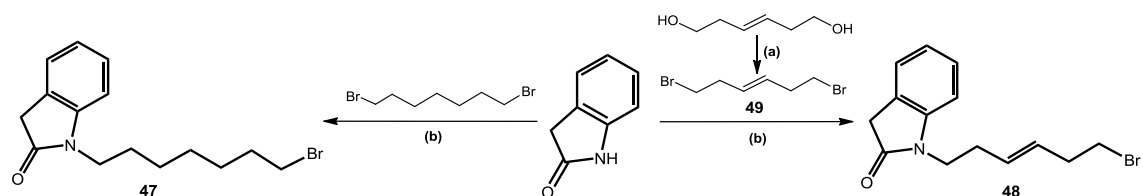


Esquema 8



Reactivos: (a) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina, Et₃N, acetonitrilo, 60 °C, 24 h, 67-80%. (b) (±)-*trans*-decahydroisoquinolina, Et₃N, acetonitrilo, 60 °C, 24 h, 73-79%.

Esquema 9



Reactivos: (a) CBr₄, PPh₃, diclorometano, 30 °C, 15 h, 76%. (b) K₂CO₃, acetonitrilo, reflujo, 3-20 h, 60%.

Esquema 10

A continuación, se llevó a cabo la determinación de la afinidad de los compuestos sintetizados **40-46** por los receptores serotoninérgicos 5-HT₇ y 5-HT_{1A}. Los valores de K_i (nM) obtenidos en los ensayos de desplazamiento de radioligando (véase apartado A.3.2) corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado (Tabla 2).

Los nuevos compuestos exhiben elevada afinidad por el 5-HT₇R y son inactivos en el 5-HT_{1A}R, lo que confirma la hipótesis de selectividad propuesta. Así, se identificaron los *leads* **42** (UCM-20509) y **46** (UCM-26709) con unos perfiles optimizados tanto de afinidad 5-HT₇ ($K_i = 0,7$ y $2,7$ nM, respectivamente) como de selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A} (ratio = 1428 y 370, respectivamente).

Tabla 2. Afinidades de los compuestos **40-46** por los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A}, in vitro.

Compuesto	Espaciador	$K_i \pm E.E.$ (nM) ^a	
		5-HT ₇	5-HT _{1A}
40		36 ± 3	> 1000
41		28 ± 6	523 ± 7
42 (UCM-20509)		0,7 ± 1	> 1000
43^b		62 ± 7	> 1000
44^b		41 ± 8	491 ± 3
45^b		29 ± 5	> 1000
46 (UCM-26709)^b		2,7 ± 1	> 1000

^aLos valores obtenidos corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado. ^bCompuestos racémicos.

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización funcional de los *leads* optimizados **42** y **46**, mediante la evaluación de su efecto sobre la actividad de la AC (véase apartado A.3.2). Los compuestos **42** y **46** indujeron un incremento dosis-dependiente de los niveles de AMPc, si bien con un bajo efecto máximo de activación en ambos casos (Figura 11). En la Tabla 3 se indica la CE_{50} , calculada mediante regresión no lineal de la curva obtenida para seis concentraciones diferentes de compuesto. Por otro lado, tras el pretratamiento con serotonina, los ligandos **42** y **46** indujeron una disminución dosis-dependiente de la concentración de AMPc con un efecto inhibitorio máximo de 81 y 66%, respectivamente (Figura 12). En la Tabla 3 se recogen los valores de concentración que producen la mitad de dicho efecto, CI_{50} , así como las constantes de inhibición, calculadas según la expresión $K_b = CI_{50} / 1 + ([5-HT] / CE_{50}(5-HT))$, donde $[5-HT] = 300$ nM y la CE_{50} determinada para la 5-HT es 17 nM. Estos datos indican que los ligandos **42** y **46** presentan un marcado carácter antagonista. Por tanto, la optimización del *lead* UCM-3307 (**18**) ha permitido la identificación en el presente trabajo de los nuevos antagonistas del 5-HT₇R UCM-20509 (**42**) y UCM-26709 (**46**) con elevada potencia y afinidad.

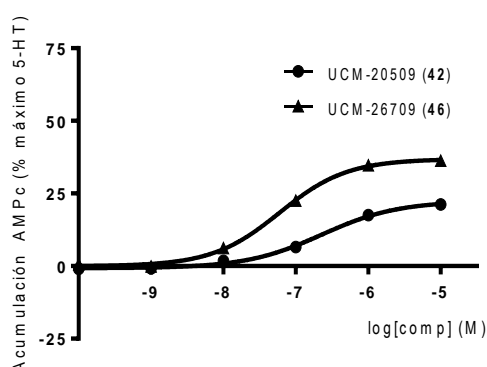


Figura 11. Efecto agonista de los ligandos **42** (UCM-20509) y **46** (UCM-26709) en el h5-HT₇R.

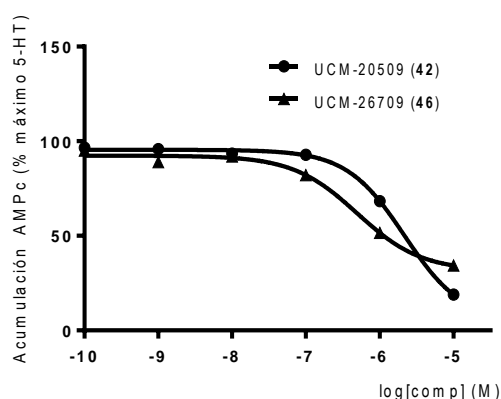


Figura 12. Efecto antagonista de los ligandos **42** (UCM-20509) y **46** (UCM-26709) en el h5-HT₇R.

Tabla 3. Actividad funcional de los nuevos ligandos del receptor serotoninérgico h5-HT₇ identificados.

Ligando	$CE_{50} \pm E.E.$ (μ M)	Efecto máximo de activación (%)	CI_{50} (μ M)	K_b (nM)	Efecto inhibitorio máximo (%)
UCM-20509 (42)	$0,21 \pm 0,04$	21 ± 1	2,2	84	81 ± 2
UCM-26709 (46)	$0,061 \pm 0,003$	36 ± 1	2,3	88	66 ± 2
UCM-3307 (18)	$0,31 \pm 0,04$	40 ± 1	> 10	---	43 ± 4
5-HT	$0,016 \pm 0,001$	---	---	---	---
mesulergina	---	---	$0,20 \pm 0,08$	12 ± 1	---

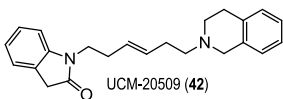
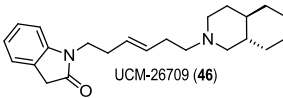
El conjunto de procesos por los que pasa un fármaco desde que se administra hasta que llega a su diana farmacológica, para poder desarrollar su acción, se denomina farmacocinética o ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excrección). La evaluación de las propiedades farmacocinéticas y la seguridad de un fármaco forma parte integral del proceso de desarrollo de un nuevo candidato. La mejora en el tratamiento de los problemas farmacocinéticos y su abordaje en etapas tempranas ha disminuido en las últimas décadas el número de fármacos retirados del proceso de desarrollo por este motivo. El objetivo de los estudios ADME es caracterizar la evolución de un candidato a fármaco en el organismo. Normalmente interesa conocer la concentración del compuesto en el sitio de acción. Esta concentración es muy difícil de determinar y puede asumirse que será parecida a la concentración en plasma.

Con el fin de obtener una estimación *in silico* de las propiedades ADME, se han determinado los valores de LogP calculado (cLogP) y del área topológica polar superficial (tPSA) (Tabla 4), la cual se puede definir como la suma de las contribuciones superficiales de los átomos polares de la molécula (usualmente átomos de oxígeno, nitrógeno y los hidrógenos unidos a ellos) y cuyos valores correlacionan bien con las propiedades de transporte relacionadas con la absorción intestinal, siendo deseables valores inferiores a 50 Å² para posibilitar la administración oral de fármacos que actúan en el SNC.¹²³

Por otro lado, para caracterizar experimentalmente el perfil farmacocinético de los nuevos antagonistas del receptor serotoninérgico h5-HT₇ identificados UCM-20509 (**42**) y UCM-26709 (**46**), se ha llevado a cabo el estudio de su estabilidad *in vitro* frente al metabolismo hepático empleando microsomas como modelo de éste. Así, para determinar la estabilidad en microsomas de hígado de rata (RLM) y humanos (HLM), los compuestos se incubaron a 37 °C con la fracción microsomal seleccionada en presencia del cosustrato fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH). A continuación, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y, tras separar las proteínas por centrifugación, la cantidad de compuesto presente en el sobrenadante se semicuantificó mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM), integrando el pico correspondiente al compuesto de interés (M+H)⁺ y normalizando dicha área respecto al valor inicial a tiempo 0 (100%). El tiempo de vida media (t_{1/2}) del compuesto se determinó a partir del ajuste de la curva resultante a una ecuación de decaimiento exponencial.

Los datos de estabilidad frente a microsomas obtenidos para los ligandos **42** y **46** (Tabla 4) indican unos t_{1/2} que pueden considerarse moderados (encontrándose en el mismo rango que los presentados, en condiciones similares a las ensayadas, por compuestos empleados en estudios *in vivo*) y semejantes en ambas especies.

Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas in silico e in vitro de los nuevos antagonistas del receptor serotoninérgico h5-HT₇ identificados.

Ligando	Masa molar (base libre)	cLogP	tPSA (Å ²)	t _{1/2} en RLM (min)	t _{1/2} en HLM (min)
 UCM-20509 (42)	346,47	3,982	23,55	10,6	13,2
 UCM-26709 (46)	352,51	4,754	23,55	13,9	18,7

A.3.4. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DEL ANTAGONISTA UCM-20509 (**42**) EN MODELOS IN VIVO

Teniendo en cuenta los resultados in vitro, el compuesto UCM-20509 (**42**) ha sido caracterizado como un antagonista potente del 5-HT₇R ($K_i = 0,7$ nM; $K_b = 84$ nM), con selectividad frente al 5-HT_{1A}R ($K_i > 1000$ nM) y con unas propiedades farmacocinéticas moderadas ($t_{1/2} \sim 11$ -13 min). De acuerdo con este prometedor perfil, se estudió su potencial antidepressivo en los modelos animales de suspensión por la cola y natación forzada, en colaboración con el Dr. Peter B. Hedlund, del Scripps Research Institute.

En primer lugar, se evaluó el carácter antagonista de UCM-20509 in vivo determinando su efecto en la hipotermia inducida por 8-OH-DPAT en ratones. UCM-20509 se administró por vía intraperitoneal (ip) 30 minutos antes que 8-OH-DPAT y los cambios en la temperatura corporal se determinaron como efecto agudo (cambio máximo durante los primeros 30 minutos) y efecto global (área bajo la curva para el período de registro completo de 2 horas). Como era de esperar, 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg, ip) indujo hipotermia (Figura 13), la cual pudo ser revertida por UCM-20509 a 1 mg/kg, pero no a 0,3 mg/kg, cuando se evalúa el efecto global. UCM-20509 (0,3 y 1 mg/kg) por sí mismo

no tuvo efecto sobre la temperatura corporal. Por tanto, el nuevo ligando 5-HT₇ UCM-20509 se comporta como un antagonista in vivo.

El test de suspensión por la cola se llevó a cabo durante 6 minutos y la duración de la inmovilidad se determinó para los últimos 4 minutos del ensayo. La inmovilidad se define como la ausencia de todo tipo de movimiento, excepto el respiratorio. A la dosis de 1 mg/kg ip, UCM-20509 redujo de forma significativa la inmovilidad en comparación con el vehículo (Figura 14A).

El test de natación forzada se realizó durante 6 minutos y la inmovilidad se determinó para los últimos 4 minutos del ensayo. En este test, la inmovilidad se define como la ausencia de cualquier movimiento excepto el mínimo movimiento requerido por el ratón para mantener su cabeza por encima de la superficie del agua. De nuevo, UCM-20509 (1 mg/kg, ip) redujo significativamente la inmovilidad en comparación con el vehículo control (Figura 14B).

En conjunto, el comportamiento del antagonista del 5-HT₇R identificado en este trabajo UCM-20509 (**42**) en los modelos in vivo revela el interés de este compuesto y su posible aplicabilidad terapéutica en trastornos de depresión.

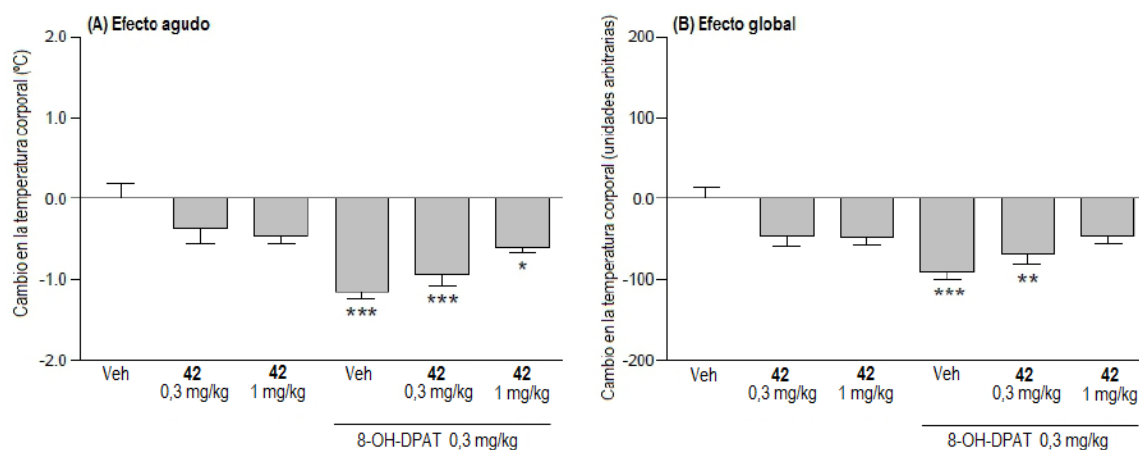


Figura 13. Efecto agudo (A) y global (B) de UCM-20509 (**42**) en la hipotermia inducida por 8-OH-DPAT. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. N = 5-7 animales/grupo.

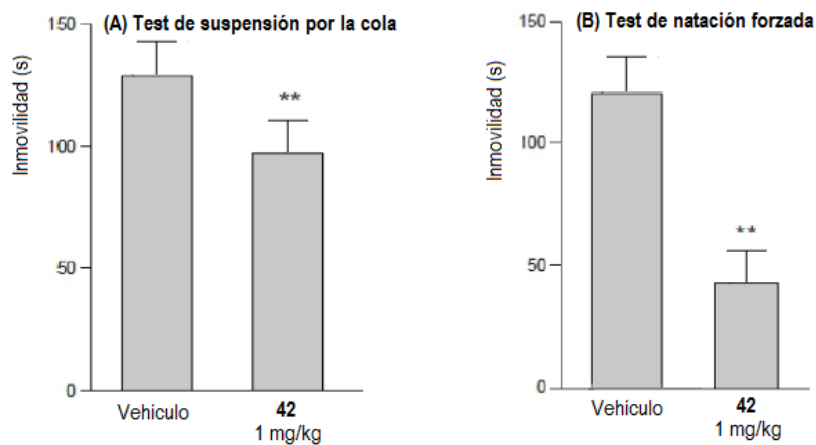


Figura 14. Efecto de UCM-20509 (**42**) en la inmovilidad de ratones en el test de suspensión por la cola (A) y en el test de natación forzada (B). **P < 0.01 indican reducción significativa de inmovilidad vs el vehículo. N = 7-9 animales/grupo.

A.4. PARTE EXPERIMENTAL

A.4.1. SÍNTESIS

Los puntos de fusión (p.f.) se han determinado en un aparato Stuart-Scientific. Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un espectrofotómetro "Bruker Tensor 27" equipado con un accesorio ATR Specac con cristal de diamante para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR) y las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se han registrado a temperatura ambiente y han sido obtenidos en los espectrómetros "Bruker 200-AC" a 200 y 50 MHz, respectivamente; "Bruker DPX 300" a 300 y 75 MHz; "Bruker AV 500", a 500 y 125 MHz y "Bruker AVIII 700", a 700 y 175 MHz, del Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de RMN de la UCM. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna; las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz) y se han calculado considerando sistemas de primer orden en todos los casos. En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), qt (quintuplete), m (multiplete) y a (ancho). La espectrometría de masas (EM) se ha llevado a cabo en un instrumento FTMS Bruker APEX Q IV utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI) en el CAI de EM de la UCM. El análisis de HPLC-EM se ha llevado a cabo en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL. La separación se ha realizado con una columna Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4,6 mm x 12,5 mm) y la fase móvil empleada consiste en un gradiente de A (agua:acetonitrilo 95:5) y B (agua:acetonitrilo 5:95) con un 0,1% de hidróxido amónico y 0,1% de ácido fórmico como aditivos. Los espectros de masas se han llevado a cabo utilizando la técnica ESI. Los picos correspondientes al ión molecular más una unidad se indican como $(\text{M}+\text{H})^+$. Los datos de análisis

elemental cuantitativo (C, H, N) se han obtenido en un instrumento LECO CHNS-932 en el CAI de Microanálisis Elemental de la UCM.

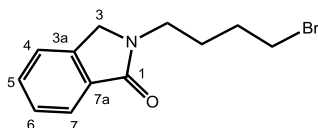
Las reacciones de hidrogenación se han realizado en un hidrogenador "Parr". La cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV (254 nm), yodo, disolución etanólica al 5% de ninhidrina o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico. Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 230-400 mesh ASTM), así como un equipo de cromatografía flash Varian 971-FP con cartuchos de gel de sílice Super Flash Si50.

Todos los productos de partida, reactivos y disolventes se han adquirido con alto grado de pureza en Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Panreac, Lancaster, Scharlab o Sigma. La trietilamina se secó sobre hidruro cálcico y se destiló antes de su utilización. El éter etílico y el diclorometano anhidros se obtuvieron por agitación sobre hidruro cálcico o sodio seguida de destilación bajo argón. El tetrahidrofurano anhidro se utilizó recién destilado bajo argón sobre sodio y benzofenona como indicador.

A.4.1.1. 2-(ω -Bromoalquil)isoindolin-1-onas, **21** y **22**

A una disolución de 35 mmol de 1-(4-bromobutil)ftalimida ó 1-(5-bromopentil)ftalimida en 65 mL de ácido acético y 13 mL de HBr se le añaden 10,20 g (85 mmol) de Sn y la reacción se calienta a reflujo durante 6 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la mezcla se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo resultante se resuspende en agua (50 mL) y se extrae con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna, obteniéndose **21** ó **22** (aceite).

• 2-(4-Bromobutil)isoindolin-1-ona, **21**¹⁰⁴



Rto. 30%.

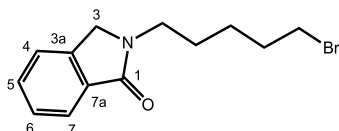
Cromatografía: hexano→hexano/acetato de etilo 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1682 (CO), 1620, 1593, 1472, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,74-1,97 (m, 4H, 2CH₂), 3,45 (t, *J* = 6,1, 2H, CH₂Br), 3,64 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂NCO), 4,37 (s, 2H, 2H₃), 7,39-7,56 (m, 3H, H₄, H₅, H₆), 7,79-7,84 (m, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 26,9; 29,8 (2CH₂), 33,4 (CH₂Br), 41,3 (CH₂NCO), 49,9 (C₃), 122,8 (C₄), 123,8 (C₇), 128,1 (C₆), 131,3 (C₅), 132,9 (C_{7a}), 141,2 (C_{3a}), 168,7 (CO).

• 2-(5-Bromopentil)isoindolin-1-ona, **22**¹¹²



Rto. 25%.

Cromatografía: hexano→hexano/acetato de etilo 1:1.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1678 (CO), 1620, 1522, 1473, 1456 (Ar).

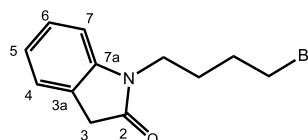
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,45-1,57 (m, 2H, CH₂), 1,70 (qt, *J* = 7,3, 2H, CH₂), 1,91 (qt, *J* = 7,3, 2H, CH₂), 3,39 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂Br), 3,62 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂NCO), 4,38 (s, 2H, 2H₃), 7,40-7,57 (m, 3H, H₄, H₅, H₆), 7,80-7,85 (m, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25,5; 26,9; 29,8 (3CH₂), 33,7 (CH₂Br), 42,2 (CH₂NCO), 50,1 (C₃), 122,8 (C₄), 123,8 (C₇), 128,2 (C₆), 131,4 (C₅), 133,1 (C_{7a}), 141,2 (C_{3a}), 168,7 (CO).

A.4.1.2. Derivados halogenados de 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **23-29**, **47**, **48**

A una disolución de 0,80 g (6 mmol) de 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona y 8 mmol del correspondiente derivado dihalogenado en 90 mL de acetonitrilo anhidro, se le añaden 1,66 g (12 mmol) de K₂CO₃ (compuestos **23-27**, **47**, **48**) ó 2,90 g (9 mmol) de Cs₂CO₃ (compuestos **28**, **29**) y la reacción se calienta a reflujo durante 3-20 horas, bajo atmósfera de argón. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la mezcla se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo resultante se resuspende en agua (30 mL) y se extrae con diclorometano (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose **23-29**.

• 1-(4-Bromobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **23**¹⁰⁵



Rto. 30% (aceite).

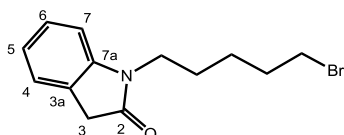
Cromatografía: hexano:acetato de etilo 9:1→8,5:1,5.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1707 (CO), 1612, 1488, 1464, 1447 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,86-1,94 (m, 4H, 2CH₂), 3,46 (t, *J* = 6,3, 2H, CH₂Br), 3,51 (s, 2H, 2H₃), 3,76 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂NCO), 6,86 (d, *J* = 7,8, 1H, H₇), 7,05 (t, *J* = 7,5, 1H, H₅), 7,25-7,29 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25,8; 29,6 (2CH₂), 32,9 (CH₂Br), 35,6 (C₃), 38,8 (CH₂NCO), 108,1 (C₇), 122,2 (C₅), 124,4 (C₄), 124,5 (C_{3a}), 127,7 (C₆), 144,2 (C_{7a}), 174,9 (CO).

• 1-(5-Bromopentil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **24**¹⁰⁵



Rto. 40% (aceite).

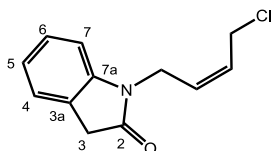
Cromatografía: hexano/acetato de etilo 9:1 → 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1707 (CO), 1614, 1491, 1468, 1443 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,43-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,71 (qt, *J* = 6,9, 2H, CH₂), 1,95 (qt, *J* = 6,9, 2H, CH₂), 3,38 (t, *J* = 6,7, 2H, CH₂Br), 3,48 (s, 2H, 2H₃), 3,73 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂NCO), 6,85 (d, *J* = 7,7, 1H, H₇), 6,99 (t, *J* = 7,3, 1H, H₅), 7,12-7,22 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25,6; 26,7; 32,4 (3CH₂), 33,5 (CH₂Br), 35,9 (C₃), 39,8 (CH₂NCO), 108,4 (C₇), 122,3 (C₅), 124,6 (C₄), 124,8 (C_{3a}), 127,9 (C₆), 144,6 (C_{7a}), 175,1 (CO).

• 1-[(2Z)-4-Cloro-2-butenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **25**



Rto. 27%; p.f. 76-78 °C.

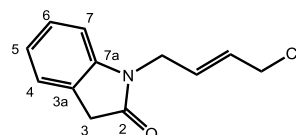
Cromatografía: hexano/acetato de etilo 8,5:1,5 → 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1708 (CO), 1616, 1488, 1465 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3,48 (s, 2H, 2H₃), 4,19 (d, *J* = 7,8, 2H, CH₂Cl), 4,39 (d, *J* = 6,7, 2H, CH₂NCO), 5,51-5,63 (m, 1H, =CH), 5,76-5,89 (m, 1H, =CH), 6,79 (d, *J* = 7,6, 1H, H₇), 6,98 (t, *J* = 7,4, 1H, H₅), 7,17-7,24 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 35,7 (C₃), 36,5 (CH₂Cl), 38,6 (CH₂NCO), 108,5 (C₇), 122,5 (C₅), 124,5 (C_{3a}, C₄), 127,9 (C₆), 128,4; 129,2 (CH=CH), 144,4 (C_{7a}), 175,0 (CO).

• 1-[(2E)-4-Cloro-2-butenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **26**



Rto. 25%; p.f. 72-74 °C.

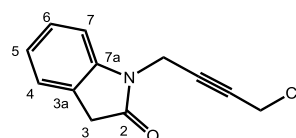
Cromatografía: hexano/acetato de etilo 9,5:0,5.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1712 (CO), 1616, 1489, 1466 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3,51 (s, 2H, 2H₃), 3,96-3,99 (m, 2H, CH₂Cl), 4,31 (s, 2H, CH₂NCO), 5,75-5,80 (m, 2H, CH=CH), 6,76 (d, *J* = 8,5, 1H, H₇), 6,99 (t, *J* = 7,5, 1H, H₅), 7,17-7,25 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 35,8 (C₃), 41,0 (CH₂NCO), 44,0 (CH₂Cl), 108,9 (C₇), 122,6 (C₅), 124,8 (C_{3a}, C₄), 128,0; 128,1; 129,1 (C₆, CH=CH), 144,4 (C_{7a}), 175,1 (CO).

• 1-(4-Cloro-2-butenil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **27**



Rto. 25%; p.f. 69-72 °C.

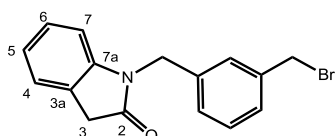
Cromatografía: hexano/acetato de etilo 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1713 (CO), 1614, 1466 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3,49 (s, 2H, 2H₃), 4,03 (s, 2H, CH₂Cl), 4,50 (s, 2H, CH₂NCO), 6,95 (d, *J* = 7,8, 1H, H₇), 7,01 (t, *J* = 7,5, 1H, H₅), 7,22-7,42 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 29,3; 30,1 (CH₂Cl, CH₂NCO), 35,6 (C₃), 78,4; 79,0 (C≡C), 109,0 (C₇), 122,8 (C₅), 124,2 (C_{3a}), 124,5 (C₄), 128,0 (C₆), 144,8 (C_{7a}), 175,1 (CO).

• 1-[3-(Bromometil)bencil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **28**



Rto. 20%; p.f. 111-113 °C.

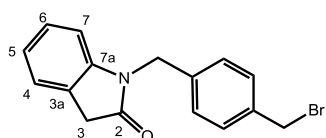
Cromatografía: hexano/acetato de etilo 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1712 (CO), 1614, 1487, 1465 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3,56 (s, 2H, 2H₃), 4,38 (s, 2H, CH₂Br), 4,84 (s, 2H, CH₂NCO), 6,64 (d, *J* = 7,7, 1H, H₇), 6,95 (t, *J* = 7,5, 1H, H₅), 7,09-7,27 (m, 6H, H₄, H₆, ArH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 33,2 (CH₂Br), 35,8 (C₃), 43,6 (CH₂NCO), 109,0 (C₇), 122,6 (C₅), 124,6 (C_{3a}, C₄), 127,5; 128,0; 128,1; 128,5; 129,4 (C₆, 4CH Ar), 136,7; 138,5 (2C Ar), 144,3 (C_{7a}), 175,2 (CO).

• 1-[4-(Bromometil)bencil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **29**



Rto. 20%; p.f. 115-117 °C.

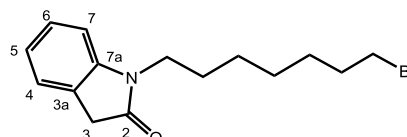
Cromatografía: diclorometano.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1716 (CO), 1614, 1490, 1468 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3,63 (s, 2H, 2H₃), 4,46 (s, 2H, CH₂Br), 4,91 (s, 2H, CH₂NCO), 6,72 (d, *J* = 7,8, 1H, H₇), 7,03 (t, *J* = 6,8, 1H, H₅), 7,16-7,27 (m, 6H, H₄, H₆, ArH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 33,5 (CH₂Br), 36,2 (C₃), 43,8 (CH₂NCO), 109,4 (C₇), 122,9 (C₅), 124,9 (C_{3a}, C₄), 128,2; 129,9 (C₆, 4CH Ar), 136,6; 137,6 (2C Ar), 144,5 (C_{7a}), 175,6 (CO).

• 1-(7-Bromoheptil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **47**



Rto. 77% (aceite).

Cromatografía: hexano:acetato de etilo 9:1 → 8,5:1,5.

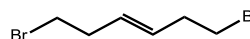
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1711 (CO), 1613, 1490, 1465 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,34-1,49 (m, 6H, 3CH₂), 1,69 (qt, *J* = 7,2, 2H, CH₂), 1,85 (qt, *J* = 7,0, 2H, CH₂), 3,40 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂Br), 3,53 (s, 2H, 2H₃), 3,71 (t, *J* = 7,2, 2H, CH₂NCO), 6,83 (d, *J* = 7,7, 1H, H₇), 7,04 (td, *J* = 7,5; 0,8, 1H, H₅), 7,25-7,30 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 27,2; 27,7; 28,4; 28,8; 33,1 (5CH₂), 34,3 (CH₂Br), 36,2 (C₃), 40,3 (CH₂NCO), 108,7 (C₇), 122,5 (C₅), 124,9 (C₄), 125,1 (C_{3a}), 128,2 (C₆), 145,0 (C_{7a}), 175,4 (CO).

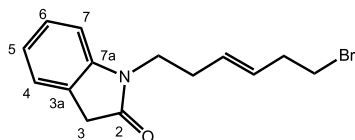
• 1-[(3E)-6-Bromo-3-hexenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **48**

(3E)-1,6-Dibromo-3-hexeno, **49**.¹²⁴ A una disolución de 0,26 g (2,2 mmol) de (3E)-3-hexeno-1,6-diol y 2,02 g (6,3 mmol) de tetrabromuro de carbono en 2,2 mL de diclorometano anhidro, se le añade una disolución de 1,50 g (6,0 mmol) de trifenilfosfina en 2,8 mL de diclorometano anhidro y la reacción se mantiene a temperatura ambiente toda la noche. A continuación, el crudo se filtra, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano → hexano:acetato de etilo 8:2), obteniéndose 0,40 g (76%) de **49** (aceite).



¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,57-2,63 (m, 4H, 2CH₂), 3,40 (t, *J* = 7,0, 4H, 2CH₂Br), 5,54-5,57 (m, 2H, CH=CH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 32,8 (2CH₂), 36,2 (2CH₂Br), 130,4 (CH=CH).

1-[(3E)-6-Bromo-3-hexen-1-il]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **48**

Rto. 60% (aceite).

Cromatografía: hexano:acetato de etilo 9:1 → 8,5:1,5.

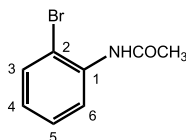
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 1711 (CO), 1614, 1489, 1466 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,40 (q, $J = 6,8$, 2H, CH_2), 2,51 (q, $J = 6,8$, 2H, CH_2), 3,29 (t, $J = 7,1$, 2H, CH_2Br), 3,53 (s, 2H, 2H_3), 3,75 (t, $J = 7,2$, 2H, CH_2NCO), 5,29-5,60 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,82 (d, $J = 7,7$ 1H, H_7), 7,02 (t, $J = 7,6$, 1H, H_5), 7,22-7,28 (m, 2H, H_4 , H_6).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 29,7; 30,7 (2CH_2), 32,4 (CH_2Br), 35,8 (C_3), 39,6 (CH_2NCO), 108,7 (C_7), 122,2 (C_5), 124,5 (C_4), 124,6 (C_{3a}), 127,8; 129,3; 129,8 (C_6 , $\text{CH}=\text{CH}$), 144,5 (C_{7a}), 175,0 (CO).

A.4.1.3. 2-Bromo-6-nitroacetanilida, **33**¹²⁵

A 5,00 g (29 mmol) de 2-bromoanilina, enfriada a 0° C, se le adicionan 5,4 mL (58 mmol) de anhídrido acético y 0,3 mL (26 mmol) de H_2SO_4 concentrado, gota a gota. Al cabo de unos minutos de agitación a temperatura ambiente, precipita un sólido blanco que se aísla por filtración, obteniéndose 5,50 g (90%) de 2-bromoacetanilida: p.f. 97-100 °C (metanol/éter etílico) (lit.¹²⁵ p.f. 96 °C).

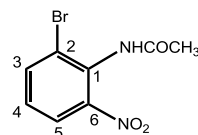


IR (KBr, cm^{-1}): 3290 (NH), 1660 (CONH), 1600, 1585 (Ar), 1540 (CONH), 1475 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,23 (s, 3H, CH_3), 6,94 (t, $J = 7,5$, 1H, H_4), 7,28 (t, $J = 7,2$, 1H, H_5), 7,50 (d, $J = 8,1$, 1H, H_6), 7,55 (sa, 1H, NH), 8,30 (d, $J = 8,1$, 1H, H_3).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 25,0 (CH_3), 113,3 (C_2), 122,0 (C_6), 125,2 (C_4), 128,0 (C_5), 132,0 (C_3), 135,5 (C_1), 168,5 (CO).

A 6,10 g (29 mmol) de 2-bromoacetanilida se le adiciona, gota a gota, una mezcla nitrante de 14 mL (28 mmol) de HNO_3 fumante y 10 mL (0,4 mmol) de ácido acético glacial, manteniendo la mezcla por debajo de 10 °C. La reacción se agita entre 0 y 5 °C durante 24 horas. A continuación, el crudo se vierte sobre agua (aproximadamente 20 mL) y precipita un sólido que se filtra y se seca a vacío. Si no precipita, la disolución se extrae con cloroformo (3 x 75 mL), se secan los extractos orgánicos sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. La mezcla 50:50 de los isómeros 2-bromo-4-nitroacetanilida y 2-bromo-6-nitroacetanilida (**33**) se identifica por RMN y éstos se separan por cromatografía en columna con hexano:diclorometano 1:1, obteniéndose en primer lugar 3,37 g (45%) del isómero 1,2,4 —p.f. 120-121 °C (éter etílico) (lit.¹²⁵ p.f. 129 °C)— y en segundo lugar 2,95 g (40%) del isómero 1,2,6 (**33**): p.f. 197-199 °C (tolueno) (lit.¹²⁵ p.f. 187 °C).



IR (KBr, cm^{-1}): 3270 (NH), 1675 (CONH), 1600, 1580 (Ar), 1535 (CONH), 1510, 1460 (Ar).

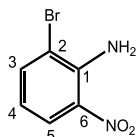
^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,20 (s, 3H, CH_3), 7,26 (t, $J = 8,8$, 1H, H_4), 7,73 (sa, 1H, NH), 7,88 (td, $J = 8,1$; 1,5, 2H, H_3/H_5).

^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 2,03 (s, 3H, CH_3), 7,45 (t, $J = 7,8$, 1H, H_4), 7,95 (d, $J = 8,4$, H_3/H_5), 8,07 (d, $J = 7,8$, H_3/H_5), 10,23 (s, 1H, NH).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 21,8 (CH_3), 122,3 (C_2), 124,0 (C_4), 128,2 (C_5), 129,0 (C_1), 137,2 (C_3), 147,5 (C_6), 168,6 (CO).

A.4.1.4. 2-Amino-3-bromoanilina, $\mathbf{34}$ ^{107,109}

Una disolución de 1,73 g (6,7 mmol) de **33** en 7,4 mL de HCl concentrado y 14,8 mL de etanol se calienta a reflujo durante 5 horas. Un vez alcanzada la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vierte sobre agua helada (25 mL) y se basifica con una disolución acuosa fría de NaOH al 10% hasta pH 9-10. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío (sin calor, ya que puede sublimar), obteniéndose 1,16 g (80%) de 2-bromo-6-nitroanilina: p.f. 75-76 °C (hexano) (lit.¹⁰⁹ p.f. 74 °C).

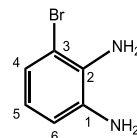


IR (KBr, cm^{-1}): 3490, 3370 (NH_2), 1620, 1575, 1510 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 6,50 (t, $J = 8,4$, 1H, H_4), 6,51 (sa, 2H, NH_2), 7,67 (dd, $J = 7,7$; 1,4, 1H, H_3), 8,12 (dd, $J = 8,7$; 1,3, 1H, H_5).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 112,4 (C_2), 116,8 (C_4), 126,2 (C_5), 139,1 (C_3 , C_6), 142,4 (C_1).

A una disolución de 4,12 g (16 mmol) de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 4,3 mL (0,8 mL/mmol) de HCl concentrado, se le añaden, en pequeñas porciones, 1,15 g (5 mmol) de 2-bromo-6-nitroanilina, evitando que la temperatura de la reacción exceda los 60 °C. La mezcla de reacción se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, el crudo se basifica con una disolución acuosa de NaOH al 20% hasta pH 9-10 y se extrae con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose 2,70 g (90%) de **34** (aceite).



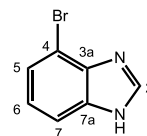
IR (KBr, cm^{-1}): 3410, 3340 (NH_2), 1625, 1580, 1485, 1465 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 3,60 (sa, 4H, 2NH_2), 6,50 (t, $J = 7,5$, 1H, H_5), 6,60 (dd, $J = 7,8$; 1,2, 1H, H_6), 6,90 (dd, $J = 7,8$; 1,5, 1H, H_4).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 111,3 (C_3), 115,8 (C_6), 120,4 (C_5), 123,6 (C_4), 133,4 (C_2), 135,6 (C_1).

A.4.1.5. 4-Bromo-1H-benzimidazol, $\mathbf{35}$ ¹⁰⁷

Una disolución de 0,86 g (5 mmol) de **34** y 0,5 mL (13 mmol) de ácido fórmico en 3,6 mL de agua se calienta a reflujo durante 3 horas. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la reacción se vierte sobre 7,5 mL de agua helada, se basifica con una disolución acuosa de KOH 1 M hasta pH 9-10 y precipita un sólido que se filtra y se seca a vacío, obteniéndose 0,72 g (80%) de **35**: p.f. 170-172 °C (acetato de etilo) (lit.¹⁰⁷ p.f. 167-168 °C).



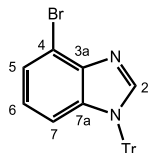
IR (KBr, cm^{-1}): 3330-3000 (NH), 1620, 1580, 1505, 1480, 1455 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 7,12 (t, $J = 7,9$, 1H, H_6), 7,35 (d, $J = 7,7$, 1H, H_5), 7,49 (d, $J = 7,9$, 1H, H_7), 8,35 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 109,7 (C_4), 113,4 (C_7), 123,0; 124,0 (C_5 , C_6), 137,4; 139,5 (C_{3a} , C_{7a}), 143,3 (C_2).

A.4.1.6. 4-Bromo-1-tritil-1H-bencimidazol, 32¹⁰⁶

A una disolución de 0,14 g (0,7 mmol) de **35** en 4 mL de tetrahidrofurano anhidro, bajo atmósfera de argón y enfriada a 0 °C, se le añaden 35 mg (0,9 mmol) de NaH al 60% y la mezcla de reacción se mantiene 30 minutos a 0 °C. A continuación, se adicionan 0,27 g (0,9 mmol) de cloruro de tritilo y, alcanzada la temperatura ambiente, se añade un cristal de yoduro de tetrabutilamonio y la reacción se calienta a reflujo durante 5 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la mezcla se diluye con agua (2 mL/mmol) y se extrae con cloroformo (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 9:1), obteniéndose 0,25 g (80%) de **32**: p.f. 225-227 °C (acetato de etilo).



IR (KBr, cm⁻¹): 1600, 1568, 1440, 1420 (Ar).

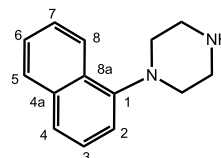
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 6,43 (d, *J* = 8,1, 1H, H₇), 6,77 (t, *J* = 8,1, 1H, H₆), 7,12-7,18 (m, 6H, tritilo, H₅), 7,24-7,30 (m, 10H, tritilo), 7,96 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 75,9 (tritilo), 113,6 (C₄), 114,8 (C₇), 123,3; 125,2 (C₅, C₆), 128,2; 128,3; 130,0 (tritilo), 135,3 (C_{7a}), 140,9 (tritilo), 143,2 (C_{3a}), 144,5 (C₂).

A.4.1.7. 1-(1-Naftil)- y 1-(1-tritil-4-bencimidazolil)-piperazinas, 30 y 31

A una disolución de 0,6 mmol de 1-bromonaftaleno ó **32** en 5 mL/mmol de tolueno seco, se le añaden, sucesivamente y bajo atmósfera de argón, 0,35 g (4 mmol) de piperazina, 24 mg (0,04 mmol) de BINAP, 84 mg (0,8 mmol) de *tert*-butoxido sódico y 0,01 mmol de acetato de paladio o Pd₂dba₃·CHCl₃, respectivamente.

La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, el disolvente se elimina a presión reducida. A continuación, el crudo se resuspende en diclorometano y se filtra sobre celita. El disolvente se evapora y el residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose **30** ó **31**.

• 1-(1-Naftil)piperazina, 30¹²⁶

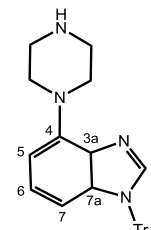
Cromatografía: acetato de etilo→acetato de etilo:etanol 9,5:0,5.

Rto. 70%; p.f. 99-101 °C (lit.¹²⁶ p.e. 148-156 °C/0,1 mmHg).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1600, 1580, 1510, 1450 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,63 (s, 1H, NH), 3,02-3,20 (m, 8H, 4CH₂ piperazina), 7,03 (d, *J* = 7,4, 1H, H₂), 7,30 (t, *J* = 8,0, 1H, H₃), 7,35-7,42 (m, 2H, H₆, H₇), 7,44 (d, *J* = 8,1, 1H, H₄), 7,70-7,80 (m, 1H, H₅), 8,10-8,20 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 46,1 (2CH₂ piperazina), 53,6 (2CH₂ piperazina), 114,7 (C₂), 123,2; 123,5 (C₄, C₈), 125,2; 125,5; 125,7 (C₃, C₆, C₇), 128,2 (C₅), 128,8 (C_{8a}), 134,6 (C_{4a}), 150,0 (C₁).

• 1-(1-Tritil-4-bencimidazolil)piperazina, 31¹⁰⁶

Cromatografía: tolueno:etanol 9:1.

Rto. 60%; p.f. 104-108 °C (sublima).

IR (KBr, cm⁻¹): 3650-3340 (NH), 1590, 1490, 1440 (Ar).

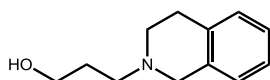
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 3,14 (m, 4H, 2CH_2 piperazina), 3,50 (m, 4H, 2CH_2 piperazina), 6,08 (d, $J = 8,4$, 1H, H_7), 6,51 (d, $J = 7,8$, 1H, H_5), 6,77 (t, $J = 7,8$, 1H, H_6), 7,17-7,27 (m, 5H, tritilo), 7,25-7,34 (m, 10H, tritilo), 7,79 (s, 1H, H_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 46,0 (CH_2 piperazina), 51,1 (CH_2 piperazina), 75,0 (tritilo), 107,0, 108,3 (C_5 , C_7), 122,5 (C_6), 127,6; 127,7; 129,7 (tritilo), 135,7; 136,5 (C_{3a} , C_{7a}), 141,0; 141,2 (tritilo, C_2), 143,8 (C_4).

A.4.1.8. ω -(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)alcanoles, **38** y **39**

Se calientan 5,0 mL (0,04 mol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina a 80 °C bajo atmósfera de argón y se añaden 0,03 mol de 2-cloroetanol ó 3-cloropropanol anhidro, calentando la mezcla a 100 °C durante 16 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añaden 3 mL de NaOH al 40%, 10 mL de agua y 15 mL de acetato de etilo y la mezcla se agita durante 30 minutos. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3 x 10 mL) y se lava con una disolución saturada de NaCl; los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (diclorometano:metanol 100:1 \rightarrow 40:1), obteniéndose **38** ó **39** (aceite).

• 3-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propanol, **38**¹²⁷



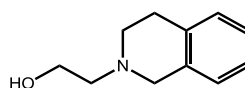
Rto. 52%.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3389 (OH), 1585, 1495 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1,83 (qt, $J = 5,5$, 2H, CH_2), 2,77-2,84 (m, 4H, NCH_2 , CH_2 isoquinolina), 2,92 (t, $J = 5,8$, 2H, NCH_2 isoquinolina), 3,72 (s, 2H, NCH_2 isoquinolina), 3,84 (t, $J = 5,2$, 2H, CH_2OH), 7,01-7,05 (m, 1H, ArH), 7,08-7,16 (m, 3H, ArH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 27,7; 29,1 (CH_2 , CH_2 isoquinolina), 50,9; 56,6; 58,8 (NCH_2 , 2NCH_2 isoquinolina), 64,7 (CH_2OH), 125,9; 126,4; 126,7; 128,7 (4CH Ar), 134,2; 134,3 (2C Ar).

• 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)etanol, **39**¹²⁸



Rto. 31%.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3385 (OH), 1658, 1498, 1454 (Ar).

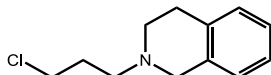
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2,73 (t, $J = 5,5$, 2H, CH_2 isoquinolina), 2,83 (t, $J = 5,8$, 2H, NCH_2), 2,93 (t, $J = 5,8$, 2H, NCH_2 isoquinolina), 3,70-3,74 (m, 4H, NCH_2 isoquinolina, CH_2OH), 6,99-7,15 (m, 4H, ArH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 29,2 (CH_2 isoquinolina), 50,7; 55,8; 58,1 (NCH_2 , 2NCH_2 isoquinolina), 59,1 (CH_2OH), 125,8; 126,4; 126,6; 128,8 (4CH Ar), 134,3; 134,6 (2C Ar).

A.4.1.9. 2-(ω -Cloroalquil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas, **36** y **37**

A una disolución de 0,05 mol de **38** ó **39** en 40 mL de 1,2-dicloroetano anhidro se le añade bajo atmósfera de argón una solución de 3,8 mL (0,05 mol) de cloruro de tionilo en 10 mL de 1,2-dicloroetano anhidro y la mezcla se agita durante una hora. La suspensión se lleva a reflujo durante una hora y media y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra. El sólido obtenido se agita a temperatura ambiente con K_2CO_3 (4 equiv) en una mezcla de éter (5 mL/mmol) y agua (5 mL/mmol), durante 16 horas. Posteriormente se separa la fase etérea, la fase acuosa se extrae con diclorometano (3 x 20 mL) y los extractos orgánicos se juntan y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, se obtiene **36** ó **37** (aceite).

• 2-(3-Cloropropil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, **36**¹²⁹



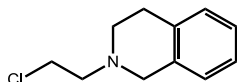
Rto. 62%.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1653, 1494 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,06 (qt, *J* = 6,7, 2H, CH₂), 2,67 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,75 (t, *J* = 5,9, 2H, NCH₂), 2,91 (t, *J* = 5,9, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,64 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,65 (t, *J* = 6,5, 2H, CH₂Cl), 7,01-7,05 (m, 1H, ArH), 7,08-7,15 (m, 3H, ArH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 29,1; 30,3 (CH₂, NCH₂ isoquinolina), 43,4 (CH₂Cl), 51,1; 55,3; 56,2 (NCH₂, 2NCH₂ isoquinolina), 125,8; 126,4; 126,7; 128,8 (4CH Ar), 134,3; 134,6 (2C Ar).

• 2-(2-Cloroetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, **37**¹¹⁰



Rto. 75%.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1660, 1498, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,73-2,89 (m, 6H, CH₂ isoquinolina, NCH₂, NCH₂ isoquinolina), 3,63-3,67 (m, 4H, CH₂Cl, NCH₂ isoquinolina), 6,93-7,13 (m, 4H, ArH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 28,8 (CH₂ isoquinolina), 41,1 (CH₂Cl), 50,9; 55,8; 59,4 (NCH₂, 2NCH₂ isoquinolina), 125,6; 126,2; 126,5; 128,6 (4CH Ar), 134,2; 134,5 (2C Ar).

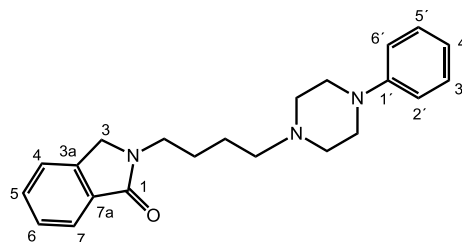
A.4.1.10. Compuestos de estructura general I, 1-18, 40-46

A una suspensión de 0,9 mmol del derivado halogenado **21-29**, **47** ó **48** y 1,5 mmol de piperazina, fenilpiperazina, 2-metoxifenilpiperazina, 3-fenilpiperidina, 4-fenilpiperidina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, (±)-*trans*-decahidroisoquinolina, o las aminas **30,31** en 4 mL de acetonitrilo seco, se le añaden 0,2 mL (1,5 mmol) de trietilamina y la mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 24 horas, bajo atmósfera de argón. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se resuspende en

agua y se extrae con diclorometano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El aceite resultante se purifica mediante cromatografía en columna en la mezcla de disolventes adecuada, obteniéndose los productos finales **1-18**, **40-46** en forma de base libre.

Los datos espectroscópicos de IR y RMN corresponden a la base libre. El compuesto puro se transforma en su clorhidrato para su análisis elemental cuantitativo y las medidas biológicas.

• 2-[4-(4-Fenilpiperazin-1-il)butil]isoindolin-1-ona, **1**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo.

Rto. 62%; p.f. 232 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1682 (CO), 1603, 1576, 1500, 1470, 1452 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,59-1,77 (m, 4H, 2CH₂), 2,44 (t, *J* = 7,3, 2H, NCH₂), 2,59 (t, *J* = 4,9, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,17 (t, *J* = 4,9, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,67 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂NCO), 4,39 (s, 2H, 2H₃), 6,81-6,94 (m, 3H, H₂, H_{4'}, H₆), 7,26 (t, *J* = 7,3, 2H, H₃, H₅), 7,42-7,60 (m, 3H, H₄, H₅, H₆), 7,85 (d, *J* = 6,8, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,1; 26,4 (2CH₂), 42,2 (CH₂NCO), 49,1 (2CH₂ piperazina), 49,9 (C₃), 53,2 (2CH₂ piperazina), 58,1 (NCH₂), 116,0 (C₂, C₆), 119,7 (C_{4'}), 122,6 (C₄), 123,7 (C₇), 128,0 (C₆), 129,1 (C_{3'}, C₅), 131,2 (C₅), 133,1 (C_{7a}), 141,1 (C_{3a}), 151,3 (C_{1'}), 168,5 (CO).

EM (ESI): 350,2 (M+H)⁺.

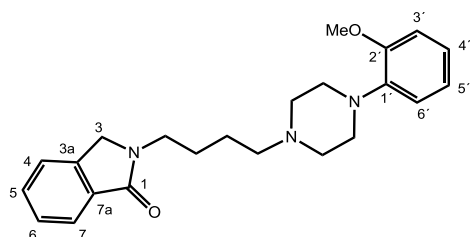
Análisis calculado para C₂₂H₂₇N₃O·2HCl·3H₂O:

C: 55,46; H: 7,40; N: 8,82.

Análisis encontrado:

C: 55,73; H: 7,28; N: 8,92.

• 2-[4-(4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il)butil]isoindolin-1-ona, **2**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo:etanol 9:1 → 8:2.

Rto. 80%; p.f. 230 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1678 (CO), 1622, 1595, 1500, 1472, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,51-1,79 (m, 4H, 2CH₂), 2,45 (t, *J* = 7,3, 2H, NCH₂), 2,63 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,07 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,65 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂NCO), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 4,38 (s, 2H, 2H₃), 6,82-7,03 (m, 4H, H₃, H₄, H₅, H₆), 7,39-7,56 (m, 3H, H₄, H₅, H₆), 7,83 (dd, *J* = 7,3; 1,7, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,2; 26,4 (2CH₂), 42,2 (CH₂NCO), 49,9 (C₃), 50,6 (2CH₂ piperazina), 53,5 (2CH₂ piperazina), 55,4 (OCH₃), 58,2 (NCH₂), 111,2 (C₆), 118,2 (C₃), 121,0 (C₄), 122,7 (C₄), 122,9 (C₅), 123,7 (C₇), 128,0 (C₆), 131,2 (C₅), 133,1 (C_{7a}), 141,1; 141,4 (C_{3a}, C₁), 152,3 (C₂), 168,5 (CO).

EM (ESI): 380,2 (M+H)⁺.

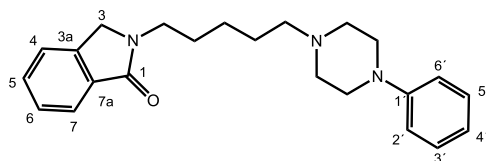
Análisis calculado para C₂₃H₂₉N₃O₂·2HCl·1/2H₂O:

C: 59,87; H: 6,99; N: 9,11.

Análisis encontrado:

C: 59,66; H: 6,74; N: 8,93.

• 2-[5-(4-Fenilpiperazin-1-il)pentil]isoindolin-1-ona, **3**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo.

Rto. 68%; p.f. 188-190 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1680 (CO), 1620, 1599, 1580, 1502, 1472, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,39 (qt, *J* = 6,8, 2H, CH₂), 1,52-1,78 (m, 4H, 2CH₂), 2,38 (t, *J* = 7,3, 2H, NCH₂), 2,58 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,18 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,63 (t, *J* = 7,3, 2H, CH₂NCO), 4,38 (s, 2H, 2H₃), 6,80-6,94 (m, 3H, H₂, H₄, H₆), 7,25 (t, *J* = 7,1, 2H, H₃, H₅), 7,40-7,56 (m, 3H, H₄, H₅, H₆), 7,84 (dd, *J* = 8,1; 1,2, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,6; 26,1; 28,2 (3CH₂), 42,1 (CH₂NCO), 48,8 (2CH₂ piperazina), 49,8 (C₃), 53,0 (2CH₂ piperazina), 58,2 (NCH₂), 116,0 (C₂, C₆), 119,6 (C₄), 122,5 (C₄), 123,6 (C₇), 127,9 (C₆), 129,0 (C₃, C₅), 131,1 (C₅), 132,9 (C_{7a}), 141,0 (C_{3a}), 151,1 (C₁), 168,4 (CO).

EM (ESI): 364,2 (M+H).

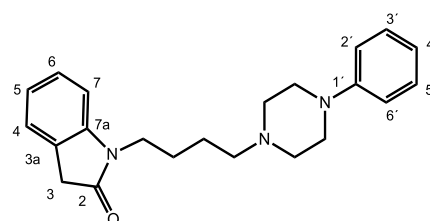
Análisis calculado para C₂₃H₂₉N₃O·2HCl·1/2H₂O:

C: 62,02; H: 7,24; N: 9,43.

Análisis encontrado:

C: 62,05; H: 7,12; N: 9,27.

• 1-[4-(4-Fenilpiperazin-1-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **4**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo → acetato de etilo:etanol 8:2.

Rto. 79%; p.f. 218 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1701 (CO), 1614, 1597, 1500, 1466, 1452 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,54-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 2,43 (t, *J* = 7,3, 2H, NCH₂), 2,59 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,19 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,53 (s, 2H, 2H₃), 3,75 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂NCO), 6,81-6,95

m, 4H, H₇, H₂, H₄, H₆), 7,02 (td, *J* = 7,3; 1,0, 1H, H₅), 7,22-7,31 (m, 4H, H₄, H₆, H₃, H₅).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,0; 25,2 (2CH₂), 35,7 (C₃), 39,6 (CH₂NCO), 49,0 (2CH₂ piperazina), 53,1 (2CH₂ piperazina), 57,8 (NCH₂), 108,2 (C₇), 115,9 (C₂, C₆), 119,5 (C₄), 122,0 (C₅), 124,3 (C₄), 124,5 (C_{3a}), 127,7 (C₆), 129,0 (C₃, C₅), 144,5 (C_{7a}), 151,2 (C_{1'}), 174,9 (CO).

EM (ESI): 350,2 (M+H)⁺.

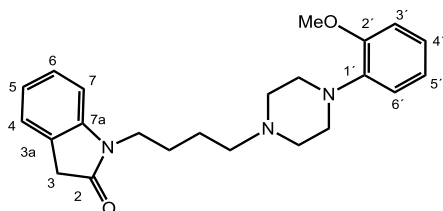
Análisis calculado para C₂₂H₂₇N₃O·HCl·4/3H₂O:

C: 64,46; H: 7,55; N: 10,25.

Análisis encontrado:

C: 64,45; H: 7,78; N: 10,25.

- 1-[4-(4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **5**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo:etanol 8:2.

Rto. 91%; p.f. 198-201 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1703 (CO), 1612, 1601, 1578, 1495, 1466, 1447 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,59 (qt, *J* = 6,9, 2H, CH₂), 1,72 (qt, *J* = 7,5, 2H, CH₂), 2,42 (t, *J* = 7,5, 2H, NCH₂), 2,62 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,06 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,50 (s, 2H, 2H₃), 3,73 (t, *J* = 7,2, 2H, CH₂NCO), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 6,80-7,03 (m, 6H, H₅, H₇, H₃, H₄, H₅, H₆), 7,19-7,27 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,2; 25,4 (2CH₂), 35,8 (C₃), 39,8 (CH₂NCO), 50,7 (2CH₂ piperazina), 53,5 (2CH₂ piperazina), 55,4 (OCH₃), 58,0 (NCH₂), 108,4 (C₇), 111,2 (C₆), 118,2 (C₃), 121,0; 122,2; 122,9 (C₅, C₄, C₅), 124,5 (C₄), 124,7 (C_{3a}), 127,8 (C₆), 141,4 (C_{1'}), 144,6 (C_{7a}), 152,3 (C₂), 175,0 (CO).

EM (ESI): 380,2 (M+H)⁺.

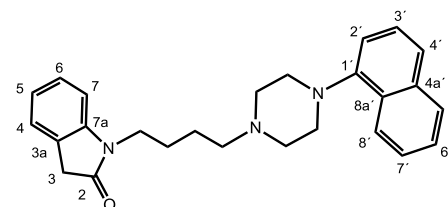
Análisis calculado para C₂₃H₂₉N₃O₂·2HCl·1/2H₂O:

C: 59,87; H: 6,99; N: 9,11.

Análisis encontrado:

C: 59,57; H: 6,89; N: 9,12.

- 1-[4-(4-(1-Naftil)piperazin-1-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **6**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo:hexano 8:2.

Rto. 65%; p.f. 226 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1701 (CO), 1614, 1491, 1468 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,64-1,70 (m, 4H, 2CH₂), 2,45 (t, *J* = 7,0, 2H, NCH₂), 2,72 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,07 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,47 (s, 2H, 2H₃), 3,71 (t, *J* = 7,0, 2H, CH₂NCO), 6,82 (d, *J* = 7,6, 1H, H₇), 6,93-7,03 (m, 2H, H₅, H₂), 7,17-7,33 (m, 2H, H₄, H₆), 7,38-7,42 (m, 3H, H₃, H₆, H₇), 7,48 (d, *J* = 8,3, 1H, H₄), 7,73-7,78 (m, 1H, H₅), 8,10-8,15 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,3; 25,4 (2CH₂), 35,9 (C₃), 39,9 (CH₂NCO), 53,0 (2CH₂ piperazina), 53,8 (2CH₂ piperazina), 58,1 (NCH₂), 108,5 (C₇), 114,7 (C₂), 122,2 (C₅), 123,7 (C₄, C₈), 124,6 (C_{3a}, C₄), 125,4; 125,8; 125,9 (C₃, C₆, C₇), 127,7 (C₆), 128,4 (C₅), 129,3 (C_{8a}), 135,1 (C_{4a}), 144,9 (C_{7a}), 150,0 (C_{1'}), 175,5 (CO).

EM (ESI): 400,1 (M+H)⁺.

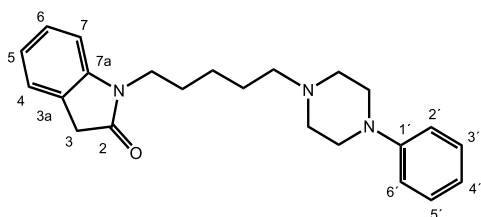
Análisis calculado para C₂₆H₂₉N₃O·2HCl·7/2H₂O:

C: 58,31; H: 7,15; N: 7,85.

Análisis encontrado:

C: 58,70; H: 7,15; N: 7,46.

- 1-[5-(4-Fenilpiperazin-1-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **7**¹²



Cromatografía: acetato de etilo.

Rto. 98%; p.f. 212-214 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1705 (CO), 1614, 1601, 1578, 1493, 1468 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,34-1,48 (m, 2H, CH₂), 1,53-1,80 (m, 4H, 2CH₂), 2,40 (t, *J* = 7,3, 2H, NCH₂), 2,61 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,21 (t, *J* = 5,1, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,52 (s, 2H, 2H₃), 3,72 (t, *J* = 7,3, 2H, CH₂NCO), 6,81-6,95 (m, 4H, H₇, H₂, H₄, H₆), 7,03 (td, *J* = 7,3; 1,0, 1H, H₅), 7,22-7,31 (m, 4H, H₄, H₆, H₃, H₅).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,8; 26,3; 27,2 (3CH₂), 35,7 (C₃), 39,8 (CH₂NCO), 48,9 (2CH₂ piperazina), 53,2 (2CH₂ piperazina), 58,3 (NCH₂), 108,2 (C₇), 116,0 (C₂, C₆), 119,5 (C₄), 122,0 (C₅), 124,4 (C₄), 124,6 (C_{3a}), 127,7 (C₆), 129,0 (C₃, C₅), 144,5 (C_{7a}), 151,2 (C₁), 174,9 (CO).

EM (ESI): 364,2 (M+H)⁺.

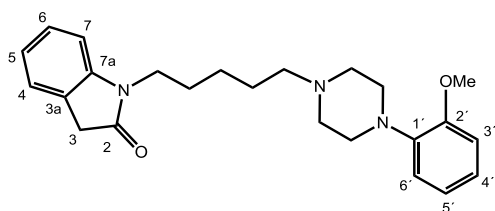
Análisis calculado para C₂₃H₂₉N₃O·2HCl·1/2H₂O:

C: 62,02; H: 7,24; N: 9,43.

Análisis encontrado:

C: 61,94; H: 7,20; N: 9,42.

- 1-[5-(4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **8**¹²



Cromatografía: acetato de etilo.

Rto. 86%; p.f. 195-197 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1701 (CO), 1614, 1597, 1500, 1466 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,36-1,48 (m, 2H, CH₂), 1,56-1,80 (m, 4H, 2CH₂), 2,46 (t, *J* = 7,5, 2H, NCH₂), 2,72 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,14 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,52 (s, 2H, 2H₃), 3,72 (t, *J* = 7,3, 2H, CH₂NCO), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 6,81-7,07 (m, 6H, H₅, H₇, H₃, H₄, H₅, H₆), 7,23-7,31 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,7; 26,0; 27,1 (3CH₂), 35,6 (C₃), 39,7 (CH₂NCO), 50,1 (2CH₂ piperazina), 53,2 (2CH₂ piperazina), 55,2 (OCH₃), 58,3 (NCH₂), 108,2 (C₇), 111,0 (C₆), 118,1 (C₃), 120,9; 122,0; 122,9 (C₅, C₄, C₅), 124,3 (C₄), 124,5 (C_{3a}), 127,7 (C₆), 141,3 (C₁), 144,5 (C_{7a}), 152,1 (C₂), 174,8 (CO).

EM (ESI): 394,2 (M+H)⁺.

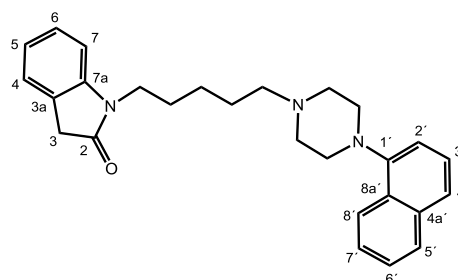
Análisis calculado para C₂₄H₃₁N₃O₂·2HCl·H₂O:

C: 59,50; H: 7,28; N: 8,67.

Análisis encontrado:

C: 59,77; H: 6,99; N: 8,64.

- 1-[5-(4-(1-Naftil)piperazin-1-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **9**¹²



Cromatografía: acetato de etilo:hexano 9:1

Rto. 56%; p.f. 234 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1705 (CO), 1614, 1466, 1400 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,38-1,50 (m, 2H, CH₂), 1,65-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 2,61 (t, *J* = 7,8, 2H, NCH₂), 2,90 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,23-3,27 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,54 (s, 2H, 2H₃), 3,74 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂NCO), 6,85

(d, $J = 7,8$, 1H, H_7), 6,99-7,13 (m, 2H, H_5 , H_2), 7,24-7,28 (m, 2H, H_4 , H_6), 7,38-7,48 (m, 3H, H_3 , H_6 , H_7), 7,62 (d, $J = 8,0$, 1H, H_4), 7,80-7,86 (m, 1H, H_5), 8,12-8,18 (m, 1H, H_8).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 24,6; 27,1 (3CH_2), 35,7 (C_3), 39,6 (CH_2NCO), 52,0 (2CH_2 piperazina), 53,4 (2CH_2 piperazina), 58,2 (NCH_2), 108,2 (C_7), 114,9 (C_2), 122,0 (C_5), 123,2; 123,7 (C_4 , C_6), 124,4 (C_4), 124,6 (C_{3a}), 125,3; 125,7 (C_3 , C_6 , C_7), 127,7 (C_6), 128,4 (C_5), 128,6 (C_{8a}), 134,6 (C_{4a}), 144,6 (C_{7a}), 150,0 (C_1), 175,1 (CO).

EM (ESI): 414,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

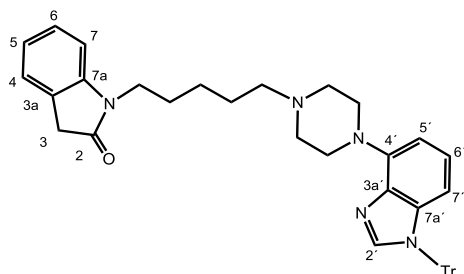
Análisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$:

C: 69,29; H: 7,32; N: 8,98.

Análisis encontrado:

C: 68,90; H: 6,93; N: 8,86.

- 1-[5-(4-(1H-Bencimidazol-4-il)piperazin-1-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **10**¹¹²



Cromatografía: acetato de etilo:etanol 9,5:0,5.

Rto. 42% (aceite).

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 1710 (CO), 1495, 1445, 1430 (Ar).

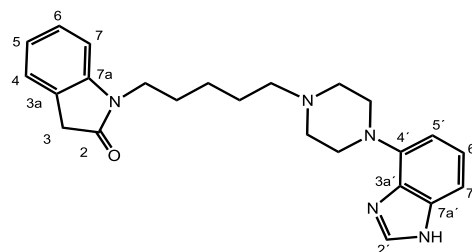
^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1,36-1,48 (m, 2H, CH_2), 1,67-1,83 (m, 4H, 2CH_2), 2,58 (t, $J = 7,8$, 2H, NCH_2), 3,17 (m, 4H, 2CH_2 piperazina), 3,47 (m, 4H, 2CH_2 piperazina), 3,51 (s, 2H, 2H_3), 3,70 (t, $J = 7,1$, 2H, CH_2NCO), 6,10 (d, $J = 8,4$, 1H, H_7), 6,54 (d, $J = 7,8$, 1H, H_5), 6,75-6,87 (m, 2H, H_7 , H_6), 6,98-7,23 (m, 6H, tritilo, H_5), 7,25-7,37 (m, 12H, tritilo, H_4 , H_6), 7,81 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 24,7; 27,1 (3CH_2), 35,6 (C_3), 39,7 (CH_2NCO), 49,3 (2CH_2 piperazina), 53,0 (2CH_2

piperazina), 58,2 (NCH_2), 75,1 (tritilo), 107,3; 108,1; 108,7 (C_7 , C_5 , C_7), 121,9; 122,6 (C_5 , C_6), 124,2 (C_4), 124,5 (C_{3a}), 127,6; 127,8 (tritilo, C_6), 129,8 (tritilo), 135,8; 136,6 (C_{3a} , C_{7a}), 141,2; 141,5 (tritilo), 141,7 (C_2), 142,8 (C_4), 144,5 (C_{7a}), 174,8 (CO).

EM (ESI): 646,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

A una disolución de 110 mg (0,2 mmol) de 1-[5-(4-(1-tritilo-1H-benzimidazol-4-il)piperazin-1-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona en 1,4 mL de tetrahidrofurano, se le adicionan 1,4 mL de ácido acético y 1,4 mL de agua y la reacción se calienta a reflujo durante 3 horas. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la mezcla se acidifica con HCl 1 M hasta pH 1-2 y se extrae con acetato de etilo. La fase acuosa se basicifica hasta pH 9-10 con K_2CO_3 anhidro y después se extrae con diclorometano. El extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evapora, obteniéndose 40 mg (58%) de **10**.



Rto. 58%.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 1710 (CO), 1495, 1445, 1430 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1,31-1,34 (m, 2H, CH_2), 1,56-1,67 (m, 4H, 2CH_2), 2,37 (t, $J = 7,5$, 2H, NCH_2), 2,66 (m, 4H, 2CH_2 piperazina), 3,46 (m, 6H, 2CH_2 piperazina, 2H_3), 3,64 (t, $J = 7,2$, 2H, CH_2NCO), 6,59 (t, $J = 4,2$, 1H, H_7), 6,77 (d, $J = 7,7$, 1H, H_7), 6,97 (t, $J = 7,2$, 1H, H_5), 7,08-7,30 (m, 4H, H_4 , H_6 , H_5 , H_6), 7,92 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 24,6; 25,5; 27,1 (3CH_2), 35,8 (C_3), 39,7 (CH_2NCO), 49,4 (2CH_2 piperazina), 53,0 (2CH_2 piperazina), 58,1 (NCH_2), 107,0; 108,2; 108,3 (C_7 , C_5 , C_7), 122,2; 123,6 (C_5 , C_6), 124,4 (C_4), 124,5 (C_{3a}),

127,8 (C₆), 135,7; 136,5 (C_{3a}, C_{7a}), 138,7 (C₂), 142,4 (C₄), 144,4 (C_{7a}), 175,1 (CO).

EM (ESI): 404,3 (M+H)⁺.

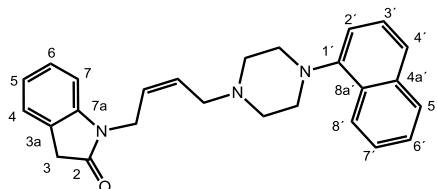
Análisis calculado para C₂₄H₂₉N₅O·3HCl·3H₂O:

C: 50,84; H: 6,76; N: 12,35.

Análisis encontrado:

C: 50,45; H: 6,37; N: 11,96.

- 1-[(2Z)-4-[4-(1-Naftil) piperazin-1-il]-2-butenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **11**¹²



Cromatografía: hexano:acetato de etilo 3:7.

Rto. 42%; p.f. 226 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1701 (CO), 1624, 1469, 1423 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,79 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,19 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,33 (m, 2H, NCH₂), 3,49 (s, 2H, 2H₃), 4,41 (d, J = 6,5, 2H, CH₂NCO), 5,50-5,68 (m, 1H, =CH), 5,75-5,90 (m, 1H, =CH), 6,82 (d, J = 7,5, 1H, H₇), 6,95-7,08 (m, 2H, H₅, H₂), 7,14-7,31 (m, 2H, H₄, H₆), 7,38 (t, J = 8,2, 1H, H₃), 7,39-7,50 (m, 2H, H₆, H₇), 7,51 (d, J = 8,2, 1H, H₄), 7,74-7,80 (m, 1H, H₅), 8,11-8,15 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 35,8 (C₃), 37,4 (CH₂NCO), 52,9 (2CH₂ piperazina), 53,3 (2CH₂ piperazina), 55,3 (NCH₂), 108,7 (C₇), 114,8 (C₂), 122,4 (C₅), 123,6; 124,5 (C₄, C₈), 124,6 (C_{3a}, C₄), 125,4; 125,8; 125,9 (C₃, C₆, C₇), 127,1 (C₆), 127,8 (C₅), 128,4 (C_{8a}), 128,9; 130,3 (CH=CH), 134,8 (C_{4a}), 144,3 (C_{7a}), 149,6 (C₁), 174,6 (CO).

EM (ESI): 398,5 (M+H)⁺.

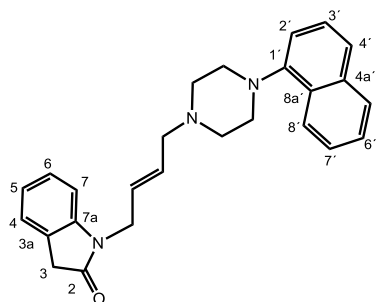
Análisis calculado para C₂₆H₂₇N₃O·2HCl·3H₂O:

C: 59,54; H: 6,73; N: 8,01.

Análisis encontrado:

C: 59,15; H: 6,72; N: 7,62.

- 1-[(2E)-4-[4-(1-Naftil) piperazin-1-il]-2-butenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **12**¹²



Cromatografía: hexano:etanol 8:2.

Rto. 44%; p.f. 173 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1709 (CO), 1616, 1489, 1435, 1400 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,61 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,19 (m, 6H, 2CH₂ piperazina, NCH₂), 3,50 (s, 2H, 2H₃), 4,33 (d, J = 4,5, 2H, CH₂NCO), 5,73-5,76 (m, 2H, CH=CH), 6,78 (d, J = 7,6, 1H, H₇), 6,93-7,05 (m, 2H, H₅, H₂), 7,14-7,21 (m, 2H, H₄, H₆), 7,31 (t, J = 8,1, 1H, H₃), 7,35-7,44 (m, 2H, H₆, H₇), 7,50 (d, J = 8,1, 1H, H₄), 7,73-7,78 (m, 1H, H₅), 8,04-8,08 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 35,7 (C₃), 41,2 (CH₂NCO), 52,6 (2CH₂ piperazina), 53,5 (2CH₂ piperazina), 60,2 (NCH₂), 108,8 (C₇), 114,8 (C₂), 122,3 (C₅), 123,4; 123,5 (C₄, C₈), 124,3 (C₄), 124,4 (C_{3a}), 125,2; 125,7; 125,8 (C₃, C₆, C₇), 127,2 (C₆), 127,6 (C₅), 128,3 (C_{8a}), 128,8; 129,7 (CH=CH), 134,6 (C_{4a}), 144,2 (C_{7a}), 149,4 (C₁), 174,6 (CO).

EM (ESI): 398,5 (M+H)⁺.

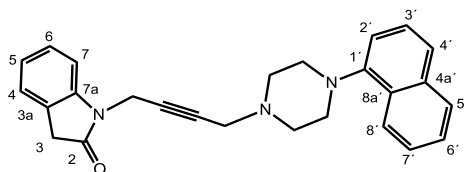
Análisis calculado para C₂₆H₂₇N₃O·2HCl·7/2H₂O:

C: 58,54; H: 6,80; N: 7,88.

Análisis encontrado:

C: 58,49; H: 6,57; N: 7,49.

- 1-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]-2-butinil}-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **13**¹¹²



Cromatografía: hexano:etanol 9:1.

Rto. 25%; p.f. 171 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1709 (CO), 1614, 1468 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,75 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,08 (m, 6H, 2CH₂ piperazina, NCH₂), 3,34 (s, 2H, NCH₂), 3,50 (s, 2H, 2H₃), 4,52 (s, 2H, CH₂NCO), 6,99-7,06 (m, 3H, H₅, H₇, H₂), 7,19-7,66 (m, 6H, H₄, H₆, H₃, H_{4'}, H_{6'}, H_{7'}), 7,74-7,79 (m, 1H, H_{5'}), 8,09-8,16 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 29,4 (CH₂NCO), 35,6 (C₃), 47,1 (NCH₂), 52,5; 52,7 (4CH₂ piperazina), 78,4; 79,0 (C≡C), 109,2 (C₇), 114,6 (C_{2'}), 122,6 (C₅), 123,4; 123,5 (C_{4'}, C_{8'}), 124,3; 124,4 (C_{3a}, C₄), 125,3; 125,7; 125,8 (C_{3'}, C_{6'}, C_{7'}), 127,8 (C₆), 128,4 (C_{5'}), 128,9 (C_{8a'}), 134,7 (C_{4a'}), 144,6 (C_{7a}), 149,4 (C_{1'}), 175,1 (CO).

EM (ESI): 396,2 (M+H)⁺.

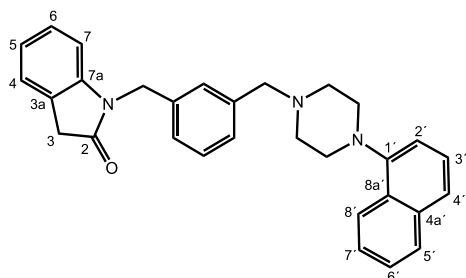
Análisis calculado para C₂₆H₂₅N₃O·2H₂O·9/2HCl:

C: 56,83; H: 6,60; N: 7,65.

Análisis encontrado:

C: 56,92; H: 6,71; N: 7,15.

- 1-{3-[[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]metil]bencil}-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **14**¹¹²



Cromatografía: hexano: acetato de etilo 7:3.

Rto. 26%; p.f. 209 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1710 (CO), 1615, 1490, 1465, 1405 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,63 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,03 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,54 (s, 2H, 2H₃/ NCH₂), 3,57 (s, 2H, NCH₂/2H₃), 4,87 (s, 2H, CH₂NCO), 6,66 (d, J = 7,7, 1H, H₇), 6,89-7,19 (m, 5H, H₄, H₅, H₆, H₂, ArH), 7,23-7,33 (m, 3H, ArH), 7,34-7,50 (m, 4H, H_{3'}, H_{4'}, H_{6'}, H_{7'}), 7,73-7,77 (m, 1H, H_{5'}), 8,09-8,14 (m, 1H, H₈).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 35,7 (C₃), 43,5; 43,6 (NCH₂, CH₂NCO), 52,7 (2CH₂ piperazina), 53,5 (2CH₂ piperazina), 62,8 (NCH₂), 109,0 (C₇), 114,5 (C_{2'}), 122,2 (C₅), 123,3; 123,5 (C_{4'}, C_{8'}), 124,3 (C₄), 124,4 (C_{3a}), 125,1; 125,6; 125,7 (C_{3'}, C_{6'}, C_{7'}), 126,0; 127,6; 128,0; 128,2; 128,4; 128,6; 128,8 (C₆, C_{5'}, C_{8a'}, 4CH Ar), 134,6 (C_{4a'}), 135,7; 138,6 (2C Ar), 144,3 (C_{7a}), 149,5 (C_{1'}), 175,0 (CO).

EM (ESI): 448,3 (M+H)⁺.

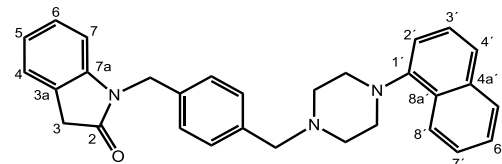
Análisis calculado para C₃₀H₂₉N₃O·2HCl·7/2H₂O:

C: 61,75; H: 6,56; N: 7,20.

Análisis encontrado:

C: 61,57; H: 6,51; N: 6,81.

- 1-(4-[[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]metil]bencil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **15**¹¹²



Cromatografía: hexano:acetato de etilo 7:3.

Rto. 25%; p.f. 210 °C (descompone).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1712 (CO), 1616, 1490, 1466, 1400 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,65 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,05 (m, 4H, 2CH₂ piperazina), 3,54 (s, 2H, 2H₃/ NCH₂), 3,55 (s, 2H, NCH₂/2H₃), 4,84 (s, 2H, CH₂NCO), 6,68 (d,

$J = 7,7$, 1H, H_7), 6,90-7,11 (m, 2H, H_5 , H_2), 7,17-7,30 (m, 6H, H_4 , H_6 , ArH), 7,32-7,40 (m, 3H, H_3 , H_6 , H_7), 7,47 (d, $J = 8,1$, 1H, H_4), 7,72-7,76 (m, 1H, H_5), 8,08-8,13 (m, 1H, H_8).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 35,8 (C_3), 43,7 (NCH_2 , CH_2NCO), 53,0 (2CH_2 piperazina), 53,7 (2CH_2 piperazina), 62,8 (NCH_2), 109,2 (C_7), 114,8 (C_2), 122,5 (C_5), 123,7 (C_4 , C_8), 124,5 (C_4 , C_{3a}), 125,4; 125,9 (C_3 , C_6 , C_7), 126,0; 127,5; 127,9; 128,5; 129,8 (C_6 , C_5 , C_{8a} , 4CH Ar), 134,9 (C_{4a}), 141,2 (2C Ar), 144,5 (C_{7a}), 149,9 (C_1), 175,3 (CO).
EM (ESI): 448,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

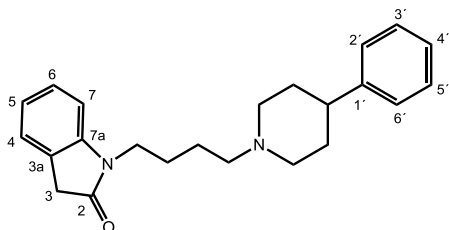
Análisis calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

C: 66,91; H: 6,18; N: 7,80.

Análisis encontrado:

C: 66,52; H: 6,57; N: 7,41.

- 1-[4-(3-Fenilpiperidin-1-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **16**¹¹²



Cromatografía: hexano:acetato de etilo:amoníaco 9:1:0,1.

Rto. 40% (aceite).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1,52-1,84 (m, 4H, 2CH_2 piperidina), 1,81-1,84 (m, 4H, 2CH_2), 2,05 (t, $J = 11,2$, 2H, 2NCH piperidina), 2,42 (t, $J = 7,1$, 2H, NCH_2), 2,47-2,50 (m, 1H, CH piperidina), 3,04 (d, $J = 10,9$, 2H, 2NCH piperidina), 3,54 (s, 2H, 2H_3), 3,76 (t, $J = 6,9$, 2H, CH_2NCO), 6,88 (d, $J = 7,8$, 1H, H_7), 7,04 (t, $J = 7,5$, 1H, H_5), 7,21-7,27 (m, 7H, H_4 , H_6 , ArH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 24,2; 25,3 (2CH_2), 33,3 (2CH_2 piperidina), 35,7 (C_3), 40,0 (CH_2NCO), 43,6 (CH piperidina), 54,2 (2NCH_2 piperidina), 58,7 (NCH_2), 108,3 (C_7), 122,0 (C_5), 124,3 (C_{3a} , C_4), 126,0; 126,7

(C_2 , C_4 , C_6), 127,7 (C_6), 128,3 (C_3 , C_5), 143,3 (C_1), 147,5 (C_{7a}), 175,2 (CO).

EM (ESI): 349,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

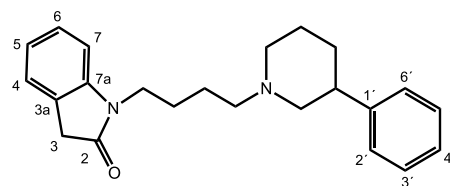
Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:

C: 58,24; H: 7,01; N: 5,49.

Análisis encontrado:

C: 58,15; H: 7,40; N: 5,88.

- 1-[4-(3-Fenilpiperidin-1-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **17**¹¹²



Cromatografía: hexano:etanol:amoníaco 9:1:0,1.

Rto. 42% (aceite).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1,36-1,90 (m, 8H, 2CH_2 piperidina, 2CH_2), 1,96 (t, $J = 11,2$, 2H, 2NCH piperidina), 2,39 (t, $J = 7,1$, 2H, NCH_2), 2,79-2,81 (m, 1H, CH piperidina), 2,97 (d, $J = 10,8$, 2H, 2NCH piperidina), 3,44 (s, 2H, 2H_3), 3,67 (t, $J = 7,0$, 2H, CH_2NCO), 6,78 (d, $J = 7,6$, 1H, H_7), 6,96 (t, $J = 7,5$, 1H, H_5), 7,10-7,27 (m, 7H, H_4 , H_6 , ArH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 22,7; 24,2 (2CH_2), 31,2 (2CH_2 piperidina), 35,8 (C_3), 40,1 (CH_2NCO), 43,9 (CH piperidina), 53,8 (2NCH_2 piperidina), 58,9 (NCH_2), 108,4 (C_7), 122,2 (C_5), 124,5 (C_{3a} , C_4), 127,3 (C_2 , C_4 , C_6), 127,8 (C_6), 128,5 (C_3 , C_5), 144,3 (C_1), 147,5 (C_{7a}), 175,2 (CO).

EM (ESI): 349,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

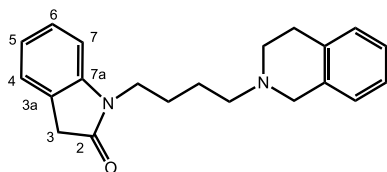
Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 9/2\text{H}_2\text{O}$:

C: 59,28; H: 8,22; N: 6,01.

Análisis encontrado:

C: 59,58; H: 7,83; N: 5,90.

- 1-[4-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H-il)butil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **18**¹¹²



Cromatografía: hexano:acetato de etilo 3:7.

Rto. 45% (aceite).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1701 (CO), 1614, 1558, 1489, 1468 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,69-1,78 (m, 4H, 2CH₂), 2,56 (t, *J* = 6,0, 2H, NCH₂), 2,73 (t, *J* = 6,0, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,90 (t, *J* = 6,0, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,50 (s, 2H, 2H₃), 3,63 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,77 (t, *J* = 6,0, 2H, CH₂NCO), 6,87 (d, *J* = 7,8, 1H, H₇), 7,00-7,10 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,11-7,13 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,22-7,27 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 24,4; 25,3, (2CH₂), 29,1 (CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 39,7 (CH₂NCO), 50,9; 56,2 (2NCH₂ isoquinolina), 57,6 (NCH₂), 108,4 (C₇), 122,1 (C₅), 124,4; 124,6 (C₄, C_{3a}), 125,6 (3CH isoquinolina), 127,8 (C₆), 128,6 (CH isoquinolina), 134,3; 134,8 (2C isoquinolina), 144,6 (C_{7a}), 174,9 (CO).

EM (ESI): 321,1 (M+H)⁺.

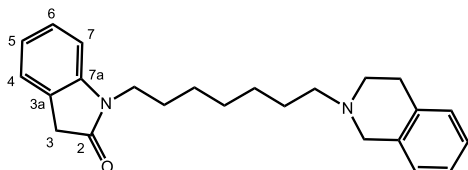
Análisis calculado para C₂₁H₂₄N₂O·HCl·5/2H₂O:

C: 62,75; H: 7,52; N: 6,97.

Análisis encontrado:

C: 63,01; H: 7,32; N: 6,58.

- 1-[7-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H-il)heptil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **40**



Cromatografía: hexano:acetato de etilo 3:7→1:9.

Rto. 76%; p.f. 98-101 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1709 (CO), 1611, 1489, 1464 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,26-1,39 (m, 6H, 3CH₂), 1,59 (qt, *J* = 6,9, 2H, CH₂), 1,67 (qt, *J* = 6,8, 2H, CH₂), 2,51 (t, *J* = 7,6, 2H, NCH₂), 2,75 (t, *J* = 5,9, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,93 (t, *J* = 5,9, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,54 (s, 2H, 2H₃), 3,65 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,72 (t, *J* = 7,4, 2H, CH₂NCO), 6,84 (d, *J* = 7,7, 1H, H₇), 7,02-7,06 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,10-7,15 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,25-7,30 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 27,2; 27,3; 27,7; 27,8; 29,2 (5CH₂), 29,5 (CH₂ isoquinolina), 36,1 (C₃), 40,3 (CH₂NCO), 51,2; 56,3 (2NCH₂ isoquinolina), 58,6 (NCH₂), 108,6 (C₇), 122,4 (C₅), 124,7 (C₄), 125,0 (C_{3a}), 125,9; 126,4; 126,9 (3CH isoquinolina), 128,1 (C₆), 128,9 (CH isoquinolina), 134,5; 134,8 (2C isoquinolina), 144,9 (C_{7a}), 175,3 (CO).

EM (ESI): 363,2 (M+H)⁺.

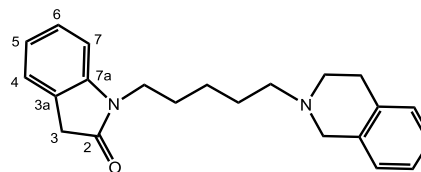
Análisis calculado para C₂₄H₃₀N₂O·HCl·3H₂O:

C: 63,63; H: 8,23; N: 6,18.

Análisis encontrado:

C: 63,69; H: 8,09; N: 6,03.

- 1-[5-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H-il)pentil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **41**



Cromatografía: hexano:acetato de etilo 3:7→1:9.

Rto. 67%; p.f. 105-107 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1710 (CO), 1614, 1489, 1466 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,45 (qt, *J* = 7,5, 2H, CH₂), 1,67 (qt, *J* = 7,5, 2H, CH₂), 1,74 (qt, *J* = 7,5, 2H, CH₂), 2,51 (t, *J* = 7,5, 2H, NCH₂), 2,72 (t, *J* = 6,0, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,91 (t, *J* = 6,0, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,53 (s, 2H, 2H₃), 3,62 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,73

(t, $J = 7,3$, 2H, CH₂NCO), 6,84 (d, $J = 7,7$, 1H, H₇), 7,01-7,08 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,09-7,15 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,24-7,29 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25,4; 27,2; 27,8 (3CH₂), 29,5 (CH₂ isoquinolina), 36,2 (C₃), 40,3 (CH₂NCO), 51,4; 56,6 (2NCH₂ isoquinolina), 58,6 (NCH₂), 108,7 (C₇), 122,5 (C₅), 124,9 (C₄), 125,1 (C_{3a}), 126,0; 126,5; 127,0 (3CH isoquinolina), 128,2 (C₆), 129,0 (CH isoquinolina), 134,7; 135,2 (2C isoquinolina), 145,0 (C_{7a}), 175,4 (CO).

EM (ESI): 335,2 (M+H)⁺.

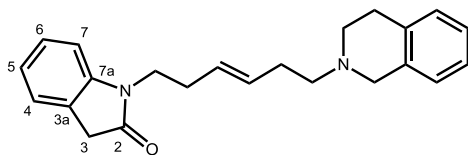
Análisis calculado para C₂₂H₂₆N₂O·HCl·2H₂O:

C: 64,93; H: 7,68; N: 6,88.

Análisis encontrado:

C: 64,60; H: 7,28; N: 6,38.

- 1-[(E)-6-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-3-hexenil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **42**



Cromatografía: acetato de etilo→acetato de etilo:metanol 9:1.

Rto. 80%; p.f. 109-111 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1712 (CO), 1614, 1489, 1466, 1464 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,24-2,32 (m, 2H, CH₂), 2,34-2,42 (m, 2H, CH₂), 2,50 (t, $J = 6,7$, 2H, NCH₂), 2,73 (t, $J = 5,9$, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,90 (t, $J = 5,8$, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,51 (s, 2H, 2H₃), 3,63 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,75 (t, $J = 7,3$, 2H, CH₂NCO), 5,50-5,55 (m, 2H, CH=CH), 6,84 (d, $J = 7,8$, 1H, H₇), 7,00-7,05 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,08-7,16 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,23-7,31 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 29,0; 30,5 (2CH₂), 30,8 (CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 39,8 (CH₂NCO), 50,8; 56,0 (2NCH₂ isoquinolina), 58,0 (NCH₂), 108,5 (C₇), 122,1 (C₅), 124,5 (C₄), 124,6 (C_{3a}), 125,6; 126,1; 126,6 (3CH isoquinolina), 127,3 (=CH), 127,8 (C₆), 128,7 (CH

isoquinolina), 131,0 (=CH), 134,3; 135,0 (2C isoquinolina), 144,6 (C_{7a}), 175,0 (CO).

EM (ESI): 347,3 (M+H)⁺.

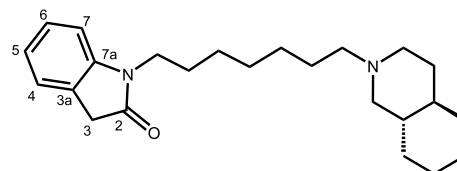
Análisis calculado para C₂₃H₂₆N₂O·HCl·5H₂O:

C: 58,40; H: 7,88; N: 5,92.

Análisis encontrado:

C: 58,43; H: 7,79; N: 5,81.

- (±)-1-{7-[Trans-octahidroisoquinolin-2(1H)-il]heptil}-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **43**



Cromatografía: acetato de etilo→acetato de etilo:etanol 9:1.

Rto. 74%; p.f. 123-125 °C.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1715 (CO), 1614, 1490, 1466, 1454 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0,90-1,65 (m, 23H, 5CH₂, 13CH isoquinolina), 1,93 (td, $J = 11,3$; 3,8, 1H, NCH isoquinolina), 2,27 (t, $J = 7,8$, 2H, NCH₂), 2,76 (d a, $J = 9,8$, 1H, NCH isoquinolina), 2,93 (d a, $J = 10,8$, 1H, NCH isoquinolina), 3,44 (s, 2H, 2H₃), 3,66 (t, $J = 7,0$, 2H, CH₂NCO), 6,75 (d, $J = 7,7$ 1H, H₇), 6,95 (td, $J = 7,5$; 0,8, 1H, H₅), 7,16-7,20 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 26,0; 26,4; 26,9; 27,4; 27,5; 29,2; 29,7; 30,7; 32,5; 32,8 (5CH₂, 5CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 40,0 (CH₂NCO), 41,3; 41,8 (2CH isoquinolina), 54,4; 58,9; 60,3 (2NCH₂ isoquinolina, NCH₂), 108,3 (C₇), 122,1 (C₅), 124,5 (C₄), 124,7 (C_{3a}), 127,8 (C₆), 144,7 (C_{7a}), 175,0 (CO).

EM (ESI): 369,3 (M+H)⁺.

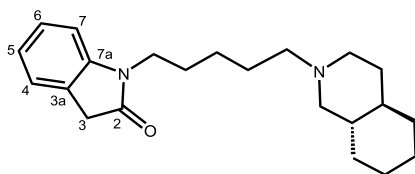
Análisis calculado para C₂₄H₃₆N₂O·HCl·5H₂O:

C: 58,22%; H: 9,57%; N: 5,66%.

Análisis encontrado:

C: 58,10%; H: 9,69%; N: 5,28%.

- (\pm) -1-[5-[*Trans*-octahidroisoquinolin-2(1*H*)-il]pentil]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, **44**



Cromatografía: acetato de etilo→acetato de etilo:etanol 8:2.

Rto. 73%; p.f. 190-194 °C.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 1708 (CO), 1613, 1489, 1466, 1447 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0,88-1,98 (m, 19H, 3CH₂, 13CH isoquinolina), 2,08 (td, $J = 11,3$; 3,8, 1H, NCH isoquinolina), 2,42 (t, $J = 8,0$, 2H, NCH₂), 2,88 (d a, $J = 9,8$, 1H, NCH isoquinolina), 3,05 (d a, $J = 11,4$, 1H, NCH isoquinolina), 3,45 (s, 2H, 2H₃), 3,64 (t, $J = 7,2$, 2H, CH₂NCO), 6,76 (d, $J = 7,8$, 1H, H₇), 6,99 (td, $J = 7,5$; 0,7, 1H, H₅), 7,17-7,22 (m, 2H, H₄, H₆).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 24,7; 25,5; 25,7; 26,3; 27,2; 30,4; 31,7; 32,5 (3CH₂, 5CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 39,7 (CH₂NCO), 40,5; 41,3 (2CH isoquinolina), 54,1; 58,4 (2NCH₂ isoquinolina), 59,7 (NCH₂), 108,4 (C₇), 122,2 (C₅), 124,5 (C₄), 124,6 (C_{3a}), 127,9 (C₆), 144,5 (C_{7a}), 175,1 (CO).

EM (ESI): 341,2 (M+H)⁺.

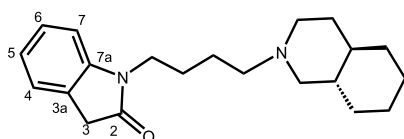
Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:

C: 61,31; H: 9,12; N: 6,50.

Análisis encontrado:

C: 61,42; H: 9,10; N: 6,40.

- (\pm) -1-[4-[*Trans*-octahidroisoquinolin-2(1*H*)-il]butil]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, **45**



Cromatografía: acetato de etilo→acetato de etilo:etanol 8:2.

Rto. 79%; p.f. 186-189 °C.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 1710 (CO), 1614, 1489, 1467, 1447 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0,74-1,80 (m, 17H, 2CH₂, 13CH isoquinolina), 1,95-2,02 (m, 1H, NCH isoquinolina), 2,42 (t, $J = 7,4$, 2H, NCH₂), 2,81 (d a, $J = 9,4$, 1H, NCH isoquinolina), 2,98 (d a, $J = 11,5$, 1H, NCH isoquinolina), 3,50 (s, 2H, 2H₃), 3,71 (t, $J = 7,0$, 2H, CH₂NCO), 6,84 (d, $J = 7,8$, 1H, H₇), 7,00 (td, $J = 7,5$; 0,7, 1H, H₅), 7,17-7,27 (m, 2H, H₄, H₆).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 23,8; 25,3; 26,0; 26,4; 30,6; 32,5; 32,8 (2CH₂, 5CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 39,7 (CH₂NCO), 41,4; 41,7 (2CH isoquinolina), 54,3; 58,1 (2NCH₂ isoquinolina), 60,2 (NCH₂), 108,4 (C₇), 122,2 (C₅), 124,4 (C₄), 124,7 (C_{3a}), 127,8 (C₆), 144,6 (C_{7a}), 175,0 (CO).

EM (ESI): 327,2 (M+H)⁺.

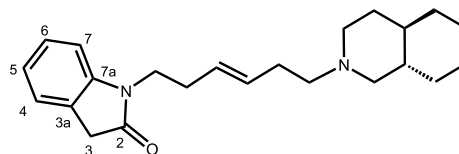
Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:

C: 60,49; H: 8,94; N: 6,72.

Análisis encontrado:

C: 60,59; H: 8,80; N: 6,65.

- (\pm) -1-[7-[*Trans*-octahidroisoquinolin-2(1*H*)-il]-3-hexenil]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, **46**



Cromatografía: acetato de etilo:metanol 9:1.

Rto. 75%; p.f. 139-142 °C.

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0,84-1,73 (m, 13H, 13CH isoquinolina), 1,91-1,95 (td, $J = 11,3$; 3,8, 1H, NCH isoquinolina), 2,26-2,28 (m, 2H, CH₂), 2,30-2,34 (m, 2H, CH₂), 2,36-2,40 (m, 2H, NCH₂), 2,73-2,77 (d a, $J = 9,4$, 1H, NCH isoquinolina), 2,78-2,93 (d a, J

= 11,5, 1H, NCH isoquinolina), 3,51 (s, 2H, 2H₃), 3,73 (t, $J = 7,4$, 2H, CH₂NCO), 5,45-5,48 (m, 2H, CH=CH), 6,83 (d, $J = 7,8$ 1H, H₇), 7,01 (t, $J = 7,5$, 1H, H₅), 7,18-7,22 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 26,5; 26,9; 30,6; 31,1; 33,3 (2CH₂, 5CH₂ isoquinolina), 36,2 (C₃), 40,2 (CH₂NCO), 42,2; 42,3 (2CH isoquinolina), 54,7; 59,0 (2NCH₂ isoquinolina), 60,8 (NCH₂), 108,9 (C₇), 122,5 (C₅), 124,8 (C₄), 125,0 (C_{3a}), 127,5; 128,2 (=CH, C₆), 131,6 (=CH), 145,0 (C_{7a}), 175,3 (CO).

EM (ESI): 353,3 (M+H).

Análisis calculado para C₂₃H₃₂N₂O·HCl·2H₂O:

C: 65,00; H: 8,77; N: 6,59.

Análisis encontrado:

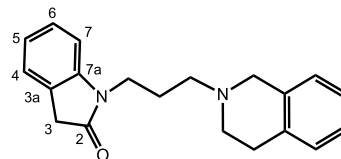
C: 65,30; H: 8,69; N: 6,49.

A.4.1.11. 1-[ω -(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)alquil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-onas, **19** y **20**

A una suspensión de 1,3 mmol de **36** ó **37** en 10 mL de acetonitrilo anhidro, se le añaden 253 mg (1,9 mmol) de 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, 359 mg (2,6 mmol) de K₂CO₃ y 21 mg (0,13 mmol) de KI y la mezcla se calienta a 60 °C durante 20 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se resuspende en agua y se extrae con diclorometano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna (diclorometano:acetato de etilo 9,5:0,5), obteniéndose **19** y **20** en forma de base libre.

Los datos espectroscópicos de IR y RMN corresponden a la base libre. El compuesto puro se transforma en su clorhidrato para su análisis elemental cuantitativo y las medidas biológicas.

- 1-[3-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **19**¹²



Rto. 44% (aceite).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1716 (CO), 1612, 1489, 1467 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1,90 (qt, $J = 7,0$, 2H, CH₂), 2,51 (t, $J = 7,0$, 2H, NCH₂), 2,64 (t, $J = 6,0$, 2H, CH₂ isoquinolina), 2,82 (t, $J = 5,9$, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,42 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,54 (s, 2H, 2H₃), 3,75 (t, $J = 7,0$, 2H, CH₂NCO), 6,85 (d, $J = 7,6$, 1H, H₇), 7,00-7,09 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,10-7,12 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,17-7,20 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25,1 (CH₂), 29,1 (CH₂ isoquinolina), 35,8 (C₃), 38,2 (CH₂NCO), 50,9; 55,3 (2NCH₂ isoquinolina), 56,1 (NCH₂), 108,4 (C₇), 122,1 (C₅), 124,4 (C₄), 124,6 (C_{3a}), 125,6; 126,1; 126,5 (3CH isoquinolina), 127,8 (C₆), 128,6 (CH isoquinolina), 134,3; 134,7 (2C isoquinolina), 144,8 (C_{7a}), 175,1 (CO).

EM (ESI): 307,2 (M+H)⁺.

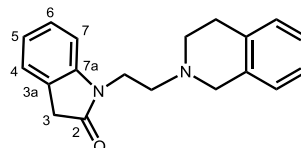
Análisis calculado para C₂₀H₂₂N₂O·HCl·3H₂O:

C: 60,52; H: 7,36; N: 7,06.

Análisis encontrado:

C: 60,91; H: 7,27; N: 6,98.

- 1-[2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)etil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, **20**¹²



Rto. 55% (aceite).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1711 (CO), 1614, 1490, 1467 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,71-2,83 (m, 6H, CH₂ isoquinolina, NCH₂, NCH₂ isoquinolina), 3,46 (s, 2H,

2H₃), 3,70 (s, 2H, NCH₂ isoquinolina), 3,92 (t, $J = 7,2$, 2H, CH₂NCO), 6,87 (d, $J = 7,7$, 1H, H₇), 7,00-7,09 (m, 2H, H₅, CH isoquinolina), 7,10-7,12 (m, 3H, 3CH isoquinolina), 7,17-7,20 (m, 2H, H₄, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 29,1 (CH₂ isoquinolina), 35,9 (C₃), 38,1 (CH₂NCO), 51,0; 54,7 (2NCH₂ isoquinolina), 56,4 (NCH₂), 108,4 (C₇), 122,3 (C₅), 124,6 (C₄), 124,7 (C_{3a}), 125,8, 126,3, 126,6 (3CH isoquinolina), 127,9 (C₆), 128,8 (CH isoquinolina), 134,3; 134,8 (2C isoquinolina), 146,4 (C_{7a}), 174,9 (CO).

EM (ESI): 293,2 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₉H₂₀N₂O·HCl·5/2H₂O:

C: 61,04; H: 7,01; N: 7,49.

Análisis encontrado:

C: 61,27; H: 7,04; N: 7,25.

A.4.2. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE RADIOLIGANDO

Los experimentos de desplazamiento de radioligando se han llevado a cabo en placas de 96 pocillos (Optiplate), utilizando un contador de centelleo 1450 MicroBeta Trilux (PerkinElmer), un aparato de filtración múltiple a vacío Filtermat Harvester (PerkinElmer), láminas de centelleo MeltiLex A (PerkinElmer) y un pH-metro CRISON (micro pH 2001). Los radioligandos específicos [³H]LSD (79,2 Ci/mmol) y [³H]-8-OHDPAT (135 Ci/mmol) han sido suministrados por NEN (PerkinElmer). Las membranas de células HEK-293 y de células CHO-K1, que sobreexpresan los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A}, respectivamente, se han adquirido en PerkinElmer.

La incubación se finaliza por filtración rápida a vacío utilizando filtros Filtermat A (Wallac), pretratados con polietilenimina (0,3% para el 5-HT₇R y 0,5% para el 5-HT_{1A}R). Los filtros se lavan de tres a cinco veces con 500 μ L de tampón Tris-HCl frío (pH 7,4 a 25 °C), y se calientan a 80 °C hasta su fusión, se dejan enfriar y finalmente se mide la radiactividad unida a las membranas empleando un contador de centelleo.

Todos los ensayos de inhibición competitiva se han realizado de dos a cuatro veces de forma independiente por triplicado. Los datos fueron analizados por un procedimiento de ajuste de curva iterativo (programa Prisma, Graph Pad), que proporcionó los valores de CI₅₀, K_i y r^2 de los compuestos ensayados, siendo calculados los valores de K_i con la ecuación de Cheng-Prusoff.¹¹¹

A.4.2.1. Receptor serotoninérgico 5-HT₇

Las membranas del receptor h5-HT₇ se resuspenden a la concentración indicada por el fabricante en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,4). Se toman alícuotas y se congelan a -80 °C hasta el momento de su utilización. Fracciones de 500 μ L de la suspensión de las membranas se incuban durante 120 min a 27 °C con [³H]LSD 3 nM, en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10⁻⁵-10⁻¹⁰ M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 540 μ L del tampón de incubación. La unión no específica se determina con clozapina 25 μ M y constituye menos del 15% de la unión total.

A.4.2.2. Receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}

Las membranas del receptor h5-HT_{1A} se resuspenden a la concentración indicada por el fabricante en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 5 mM, pH 7,4 at 25 °C). Se toman alícuotas y se congelan a -80 °C hasta el momento de su utilización. Fracciones de 20 μ L de la suspensión de membrana se incuban en la oscuridad, durante 120 minutos a 37 °C con [³H]-8-OH-DPAT 4,9 nM, en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10⁻⁵-10⁻¹⁰ M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 200 μ L del tampón de incubación. La unión no específica se determina con serotonina 10 μ M y representa menos del 20% de la unión total.

A.4.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA

Los efectos en la actividad de AC fueron determinados en CEREP,¹³⁰ de acuerdo con los métodos previamente descritos.²⁸

Brevemente, las células CHO transfectadas con el h5-HT₇R se incuban a 37 °C durante 45 minutos con el ligando objeto de estudio, en ausencia o presencia de serotonina 300 nM, y la concentración de AMPc se determina por HTRF. La actividad de AC se expresa como porcentaje del efecto máximo obtenido con serotonina 10 µM. Los valores de CE₅₀ y CI₅₀ se calculan por análisis de regresión no lineal de las curvas de concentración-respuesta con el programa Hill desarrollado en CEREP.

A.4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN MICROSOMAS DE RATA Y HUMANOS

Los compuestos objeto de estudio se incuban a 37 °C a una concentración final de 1 µM ó 5 µM en tampón fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS), junto con dos soluciones de NADPH y MgCl₂ en PBS (a una concentración final de 2 mM y 5 mM, respectivamente). Las reacciones metabólicas son iniciadas por la adición de una suspensión de microsomas de hígado, RLMs (ratas Sprague-Dawley macho de Sigma-Aldrich) o HLMs (humanos), a una concentración final de proteína de 1 mg/mL. Tras agitar las soluciones en un vórtex, se colocan en un baño de agua abierto al aire y a 37 °C. Se toman siete alícuotas diferentes a tiempos entre 0 minutos y 1 hora (RLM) ó 2 horas (HLM) y se añaden sobre 100 µL de acetonitrilo frío. El sobrenadante se separa del precipitado por centrifugación a 10000g durante 5 minutos y se hace pasar a través de un filtro jeringa de teflón de tamaño de poro de 0,2 µm (Albet Labscience).

La pérdida relativa de compuesto en el curso de la incubación se monitoriza por HPLC-EM en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL. La separación cromatográfica se lleva a cabo con una columna Agilent-Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 mm x 150 mm), junto con una precolumna (5 µm, 4,6 mm x 12,5 mm). La fase móvil empleada consiste en un gradiente de disoluciones A (agua:metanol 95:5) y B (metanol:agua 95:5) con 0,1 % de ácido fórmico y 0,1 % de hidróxido amónico como aditivos. En todos los casos se ha usado un flujo constante de 0,5 mL/min, un tiempo total de 15 minutos y el siguiente gradiente: 0 min, 60% A; 1 min, 100% B; 1-14 min, 100% B; 15 min, 60% A. El análisis de EM se ha llevado a cabo utilizando la técnica de ionización ESI en modo positivo SIM. El voltaje del capilar se ha establecido en 3,0 kV y el voltaje del fragmentador en 70 eV. La temperatura del gas de secado es de 350 °C, el flujo de 10 L/min y la presión del nebulizador de 20 psi.

Las concentraciones son cuantificadas midiendo el área bajo el pico (M+H⁺) y convertidas a porcentaje de compuesto remanente, usando el valor del área del pico de t = 0 como el 100%. El porcentaje de compuesto remanente frente al tiempo para cada compuesto se ajusta a una función de decaimiento exponencial, para determinar la constante de velocidad de primer orden y el t_{1/2} de degradación usando el programa Prism (GraphPad).

A.4.5. ENSAYO DE HIPOTERMIA IN VIVO

El efecto del compuesto objeto de estudio en la temperatura corporal de ratones C57BL/6J se ha determinado en el Scripps Research Institute, en colaboración con el Dr. Peter B. Hedlund, de acuerdo con los procedimientos previamente descritos.¹³¹

Brevemente, la temperatura corporal se mide utilizando un termómetro de sonda rectal (Physitemp BAT-7001H). Se mide un valor basal inmediatamente antes de la inyección y las mediciones se hacen a continuación, 15 y 30 minutos después de la inyección y, posteriormente, cada 30 minutos durante un período de registro total de 2 horas. Cuando se evalúan las propiedades antagonistas del compuesto, éste se administra 30 minutos antes que el agonista (8-OH-DPAT). Los cambios de la temperatura corporal se determinan como efecto pico (máximo cambio durante los primeros 30 minutos) y efecto general (área bajo la curva para el período de registro completo).

A.4.6. TEST DE SUSPENSIÓN POR LA COLA

El efecto del compuesto objeto de estudio en la inmovilidad de ratones C57BL/6J se ha determinado en el Scripps Research Institute, en colaboración con el Dr. Peter B. Hedlund, de acuerdo con los métodos previamente descritos.^{67,72}

Brevemente, para la prueba de un ratón individual, éste es suspendido por la punta de la cola unida con un trozo de cinta a una barra metálica colocada horizontalmente 50 cm por encima de la mesa. La duración de la prueba es de 6 minutos y la duración de la inmovilidad se determina para los últimos 4 minutos de la misma. La inmovilidad se define como la ausencia de todo tipo de movimiento, excepto el respiratorio.

A.4.7. TEST DE NATACIÓN FORZADA

El efecto del compuesto objeto de estudio en la inmovilidad de ratones C57BL/6J se ha evaluado en el Scripps Research Institute, en colaboración con el Dr. Peter B. Hedlund, de acuerdo con los procedimientos previamente descritos.^{67,72}

Brevemente, los ratones se colocan por separado en un cilindro de plástico transparente con un diámetro

de 16 cm y una altura de 25 cm y lleno a una altura de 10 cm con agua transparente a 25 °C. La duración de la prueba es de 6 minutos y la duración de la inmovilidad se determina para los últimos 4 minutos de la misma. La inmovilidad se define como la ausencia de todo movimiento excepto el menor movimiento requerido por el ratón para mantener su cabeza por encima de la superficie del agua.

A.4.8. MODELOS COMPUTACIONALES DE SIMULACIÓN DE LOS COMPLEJOS LIGANDO-RECEPTOR

Los modelos de las TMs 1-7 de los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A} se han construido mediante técnicas de modelización por homología utilizando la estructura cristalográfica del receptor β_2 -adrenérgico (código PDB 2RH1)^{113,114} como plantilla. Se empleó SCWRL-3.0¹³² para añadir las cadenas laterales de los residuos no conservados y Modeler 9v1¹³³ para añadir los dominios intracelulares (ILs) 1-2 y los ELs 1-3. También se incluyeron en el modelo las moléculas de agua internas 506, 519, 528, 529, 532, 534, 537, 543, 546 y 548, que favorecen las interacciones entre hélices¹¹⁴ y parecen estar conservadas en los GPCRs de la familia de la rodopsina.¹³⁴ Se utilizó el campo de fuerza de Duan et al.¹³⁵ para los péptidos y el campo de fuerza general Amber (GAFF)¹³⁶ y las cargas atómicas derivadas de HF/6-31G* para los ligandos. Las simulaciones de dinámica molecular de los complejos ligando-receptor se realizaron con el módulo Sander de AMBER 9¹³⁷ utilizando el protocolo previamente descrito.¹³⁸

A.5. CONCLUSIONES

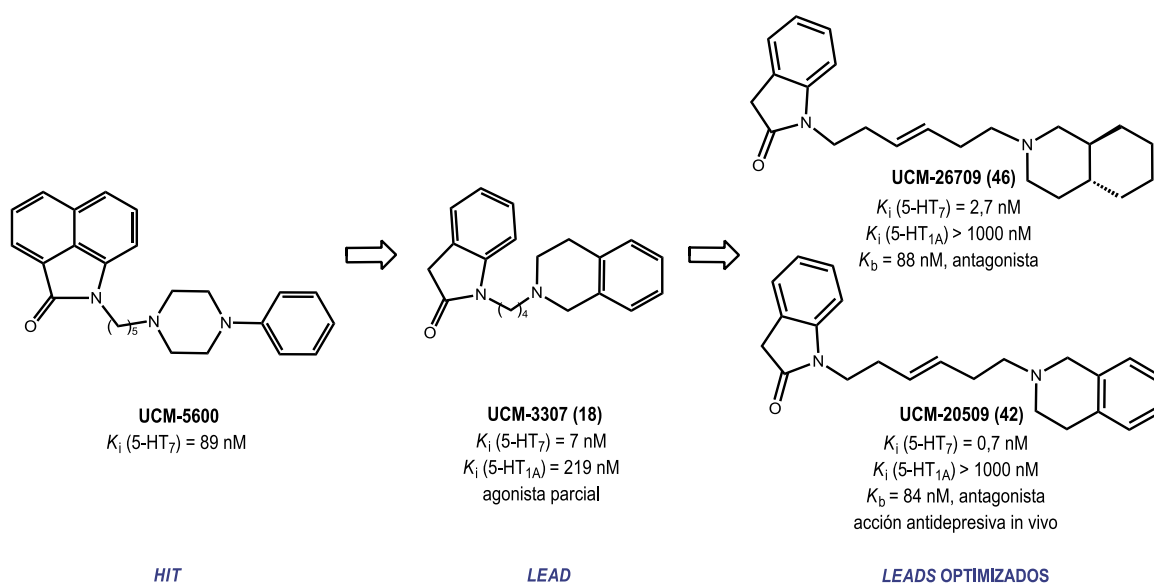
1. En el presente capítulo se ha abordado el desarrollo de nuevos ligandos del receptor serotoninérgico 5-HT₇, con objeto de explorar su aplicabilidad terapéutica. En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis de los nuevos compuestos **1-20**, con el fin de optimizar el *hit* UCM-5600 previamente identificado en nuestro grupo de investigación (*hit to lead*). A partir de los datos obtenidos en este proceso de *hit to lead*, se ha seleccionado el derivado **18** (UCM-3307) que exhibe la mayor afinidad por el 5-HT₇R (K_i = 7 nM) y la mejor ratio de selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A} (31 veces). La caracterización funcional del ligando **18** ha puesto de manifiesto su carácter de agonista parcial del h5-HT₇R.

2. La optimización del *lead* seleccionado **18** se abordó mediante el estudio de las relaciones estructura-afinidad. Así, la simulación computacional

de los complejos ligando-receptor nos ha permitido proponer una hipótesis sobre las bases moleculares de la selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A}, a partir de la cual se han diseñado y sintetizado los nuevos compuestos **40-46**. Entre ellos cabe destacar los *leads* **42** (UCM-20509) y **46** (UCM-26709), con unos perfiles optimizados de afinidad por el 5-HT₇R (K_i = 0,7 y 2,7 nM, respectivamente) y selectividad 5-HT₇/5-HT_{1A} (ratio = 1428 y 370, respectivamente).

3. Los nuevos ligandos 5-HT₇R UCM-20509 y UCM-26709 identificados en este trabajo se han caracterizado como antagonistas potentes del receptor (K_b = 84 y 88 nM, respectivamente), con propiedades farmacocinéticas moderadas in vitro.

4. El comportamiento del nuevo antagonista del 5-HT₇R UCM-20509 en los modelos in vivo de hipotermia, suspensión por la cola y natación forzada revela su posible aplicabilidad terapéutica en trastornos de depresión.



1. Howard, A.D.; McAllister, G.; Feighner, S.D.; Liu, Q.; Nargund, R.P.; Van der Ploeg, L.H.T.; Patchett, A.A. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 132-140.
2. Rosenbaum, D.M.; Rasmussen, S.G.F.; Kobilka, B.K. *Nature* **2009**, *459*, 356-363.
3. Congreve, M.; Marshall, F. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 986-996.
4. Hoffmann, C.; Zurn, A.; Bunemann, M.; Lohse, M.J. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, S358-S366.
5. Filmore, D. *Modern Drug Discovery* **2004**, *7*, 24-28.
6. Lagerström, M.C.; Schiöth, H.B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 339-357.
7. Adayev, T.; Ranasinghe, B.; Banerjee, P. *Biosci. Rep.* **2005**, *25*, 363-385.
8. Hoyer, D.; Martin, G. *Neuropharmacology* **1997**, *36*, 419-428.
9. Nichols, D.E.; Nichols, C.D. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1614-1641.
10. Grailhe, R.; Boschert, U.; Hen, R. *Serotonin Receptors and Their Ligands* **1997**, *27*, 311-323.
11. Glennon, R.A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2795-2812.
12. Shireman, B.T.; Bonaventure, P.; Carruthers, N.I. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2008**, *43*, 25-42.
13. Hedlund, P.B.; Sutcliffe, J.G. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 481-486.
14. Hedlund, P.B. *Psychopharmacology* **2009**, *206*, 345-354.
15. Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R.; Hedlund, P.B. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *129*, 120-148.
16. Shen, Y.; Monsma, F.J. Jr.; Metcalf, M.A.; Jose, P.A.; Hamblin, M.W.; Sibley, D.R. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18200-18204.
17. Tsou, A.P.; Kosaka, A.; Bach, C.; Zuppan, P.; Yee, C.; Tom, L.; Álvarez, R.; Ramsey, S.; Bonhaus, D.W.; Stefanich, E.; Jakeman, L.; Eglen, R.M.; Chan, H.W. *J. Neurochem.* **1994**, *63*, 456-464.
18. Plassat, J.L.; Amlaiky, N.; Hen, R. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 229-236.
19. Bard, J.A.; Zgombick, J.; Adham, N.; Vaysse, P.; Branchek, T.A.; Weinshank, R.L. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23422-23426.
20. Eglen, R.M.; Jasper, J.R.; Chang, D.J.; Martin, G.R. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 104-107.
21. Gelemtier, J.; Rao, P.A.; Pauls, D.L.; Hamblin, M.W.; Sibley, D.R.; Kidd, K.K. *Genomics* **1995**, *26*, 207-209.
22. Lassig, J.P.; Vachirasomtoon, K.; Hartzell, K.; Leventhal, M.; Courchesne, E.; Courchesne, R.; Lord, C.; Leventhal, B.L.; Cook, E.H.J. *Am. J. Med. Genet.* **1999**, *88*, 472-475.
23. Erdmann, J.; Nothen, M.M.; Shimron-Abarbanell, D.; Rietschel, M.; Albus, M.; Bormann, M.; Maier, W.; Franzek, E.; Korner, J.; Weigelt, B.; Fimmers, R.; Propping, P. *Mol. Psychiatry* **1996**, *1*, 392-397.
24. Heidmann, D.E.A.; Metcalf, M.A.; Kohen, R.; Hamblin, M.W. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 1372-1381.
25. Heidmann, D.E.A.; Szot, P.; Kohen, R.; Hamblin, M.W. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 1621-1632.
26. Jasper, J.R.; Kosaka, A.; To, Z.P.; Chang, D.J.; Eglen, R.M. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 126-132.
27. Stam, N.J.; Roesink, C.; Dijcks, F.; Garritsen, A.; van Herpen, A.; Olijve, W. *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 489-494.
28. Adham, N.; Zgombick, J.M.; Bard, J.; Branchek, T.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *287*, 508-514.

29. Ruat, M.; Traiffort, E.; Leurs, R.; Tardivel-Lacombe, J.; Díaz, J.; Arrang, J.M.; Schwartz, J.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8547-8551.
30. Lovenberg, T.W.; Baron, B.M.; de Lecea, L.; Miller, J.D.; Prosser, R.A.; Rea, M.A.; Foye, P.E.; Racke, M.; Slone, A.L.; Siegel, B.W.; Danielson, P.E.; Sutcliffe, J.G.; Erlander, M.G. *Neuron* **1993**, *11*, 449-458.
31. Branchek, T.A. *Semin. Neurosci.* **1995**, *7*, 375-382.
32. Obosi, L.A.; Hen, R.; Beadle, D.J.; Bermúdez, I.; King, L.A. *FEBS Lett.* **1997**, *412*, 321-324.
33. To, Z.P.; Bonhaus, D.W.; Eglen, R.M.; Jakeman, L.B. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *115*, 107-116.
34. Mengod, G.; Vilario, M.T.; Raurich, A.; López-Giménez, J.F.; Cortés, R.; Palacios, J.M. *Histochem. J.* **1996**, *28*, 747-758.
35. Neumaier, J.F.; Sexton, T.J.; Yracheta, J.; Díaz, A.M.; Brownfield, M. *J. Chem. Neuroanat.* **2001**, *21*, 63-73.
36. Waeber, C.; Moskowitz, M.A. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *283*, 31-46.
37. Gustafson, E.L.; Durkin, M.M.; Bard, J.A.; Zgombick, J.; Branchek, T.A. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 657-666.
38. Thomas, D.R.; Atkinson, P.J.; Ho, M.; Bromidge, S.M.; Lovell, P.J.; Villani, A.J.; Hagan, J.J.; Middlemiss, D.N.; Price, G.W. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 409-417.
39. Varnäs, K.; Thomas, D.R.; Tupala, E.; Tiihonen, J.; Hall, H. *Neurosci. Lett.* **2004**, *367*, 313-316.
40. Hedlund, P.B.; Danielson, P.E.; Thomas, E.A.; Slanina, K.; Carson, M.J.; Sutcliffe, J.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 1375-1380.
41. Guscott, M.; Bristow, L.J.; Hadingham, K.; Rosahl, T.W.; Beer, M.S.; Stanton, J.A.; Bromidge, F.; Owens, A.P.; Huscroft, I.; Myers, J.; Rupniak, N.M.; Patel, S.; Whiting, P.J.; Hutson, P.H.; Fone, K.C.; Biello, S.M.; Kulagowski, J.J.; McAllister, G. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 492-502.
42. Sprouse, J.; Li, X.; Stock, J.; McNeish, J.; Reynolds, L. *J. Biol. Rhythms* **2005**, *20*, 122-131.
43. Witkin, J.M.; Baez, M.; Yu, J.; Barton, M.E.; Shannon, H.E. *Epilepsy Res.* **2007**, *75*, 39-45.
44. Landry, Y.; Niederhoffer, N.; Sick, E.; Gies, J.P. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 51-63.
45. Liu, K.G.; Lo, J.R.; Comery, T.A.; Zhang, G.M.; Zhang, J.Y.; Kowal, D.M.; Smith, D.L.; Di, L.; Kerns, E.H.; Schechter, L.E.; Robichaud, A.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1115-1117.
46. Hedlund, P.B.; Sutcliffe, J.G. *5-HT₇ Receptors as Favorable Pharmacological Targets for Drug Discovery*; Humana Press.: Totowa, NJ, 2006; pp 517-35.
47. López-Rodríguez, M.L.; Benhamú, B.; Morcillo, M.J.; Porras, E.; Lavandera, J.L.; Pardo, L. *Curr. Med. Chem. - C.N.S.A.* **2004**, *4*, 203-214.
48. Leopoldo, M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 629-661.
49. Slassi, A.; Isaac, M.; Xin, T. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 1009-1027.
50. Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, 739-754.
51. Forbes, I.T.; Dabbs, S.; Duckworth, D.M.; Jennings, A.J.; King, F.D.; Lovell, P.J.; Brown, A.M.; Collin, L.; Hagan, J.J.; Middlemiss, D.N.; Riley, G.J.; Thomas, D.R.; Upton, N. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 655-657.
52. Thomas, D.R.; Gittins, S.A.; Collin, L.L.; Middlemiss, D.N.; Riley, G.; Hagan, J.; Gloger, I.; Ellis, C.E.; Forbes, I.T.; Brown, A.M. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 1300-1306.
53. Kikuchi, C.; Nagaso, H.; Hiranuma, T.; Koyama, M. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 533-535.

54. Kogan, H.A.; Marsden, C.A.; Fone, K.C.F. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 105-111.
55. Lovell, P.J.; Bromidge, S.M.; Dabbs, S.; Duckworth, D.M.; Forbes, I.T.; Jennings, A.J.; King, F.D.; Middlemiss, D.N.; Rahman, S.K.; Saunders, D.V.; Collin, L.L.; Hagan, J.J.; Riley, G.J.; Thomas, D.R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 342-345.
56. Hagan, J.J.; Price, G.W.; Jeffrey, P.; Deeks, N.J.; Stean, T.; Piper, D.; Smith, M.I.; Upton, N.; Medhurst, A.D.; Middlemiss, D.N.; Riley, G.J.; Lovell, P.J.; Bromidge, S.M.; Thomas, D.R. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 539-548.
57. Forbes, I.T.; Douglas, S.; Gribble, A.D.; Ife, R.J.; Lightfoot, A.P.; Garner, A.E.; Riley, G.J.; Jeffrey, P.; Stevens, A.J.; Stean, T.O.; Thomas, D.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3341-3344.
58. Holmberg, P.; Sohn, D.; Leideborg, R.; Caldirola, P.; Zlatoidsky, P.; Hanson, S.; Mohell, N.; Rosqvist, S.; Nordvall, G.; Johansson, A.M.; Johansson, R. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3927-3930.
59. Bosker, F.J.; Folgering, J.H.; Gladkevich, A.V.; Schmidt, A.; van der Hart, M.C.G.; Sprouse, J.; den Boer, J.A.; Westerink, B.H.C.; Cremers, T.I.F.H. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 1126-1135.
60. Brenchat, A.; Romero, L.; Bura, A.S.; García, M.; Torrens, A.; Sánchez, R.; Hamon, M.; Maldonado, R.; Buschmann, H.; Zamanillo, D.; Vela, J.M. *Fund. Clin. Pharmacol.* **2008**, *22 Suppl. 2*, 123.
61. Brenchat, A.; Romero, L.; García, M.; Pujol, M.; Burgueño, J.; Torrens, A.; Hamon, M.; Baeyens, J.M.; Buschmann, H.; Zamanillo, D.; Vela, J.M. *Pain* **2009**, *141*, 239-247.
62. Brenchat, A.; Nadal, X.; Romero, L.; Ovalle, S.; Muro, A.; Sánchez-Arroyos, R.; Portillo-Salido, E.; Pujol, M.; Montero, A.; Codony, X.; Burgueño, J.; Zamanillo, D.; Hamon, M.; Maldonado, R.; Vela, J.M. *Pain* **2010**, *149*, 483-494.
63. Monsma, F.J., Jr.; Shen, Y.; Ward, R.P.; Hamblin, M.W.; Sibley, D.R. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 320-327.
64. Mullins, U.L.; Gianutsos, G.; Eison, A.S. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21*, 352-367.
65. Cryan, J.F.; Markou, A.; Lucki, I. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 238-245.
66. Cryan, J.F.; Holmes, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 775-790.
67. Hedlund, P.B.; Huitron-Resendiz, S.; Henriksen, S.J.; Sutcliffe, J.G. *Biol. Psychiatry* **2005**, *58*, 831-837.
68. Bonaventure, P.; Kelly, L.; Aluisio, L.; Shelton, J.; Lord, B.; Galici, R.; Miller, K.; Atack, J.; Lovenberg, T.W.; Dugovic, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 690-698.
69. Wesolowska, A.; Nikiforuk, A.; Stachowicz, K.; Tatarczynska, E. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 578-586.
70. Wesolowska, A.; Nikiforuk, A.; Stachowicz, K. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *553*, 185-190.
71. Wesolowska, A.; Tatarczynska, E.; Nikiforuk, A.; Chojnacka-Wojcik, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *555*, 43-47.
72. Sarkisyan, G.; Roberts, A.J.; Hedlund, P.B. *Behav. Brain Res.* **2010**, *209*, 99-108.
73. Lecrubier, Y.; Boyer, P.; Turjanski, S.; Rein, W. *J. Affect. Disord.* **1997**, *43*, 95-103.
74. Smeraldi, E. *J. Affect. Disord.* **1998**, *48*, 47-56.
75. Lawler, C.P.; Prioleau, C.; Lewis, M.M.; Mak, C.; Jiang, D.; Schetz, J.A.; Gonzalez, A.M.; Sibley, D.R.; Mailman, R.B. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *20*, 612-627.
76. Shapiro, D.A.; Renock, S.; Arrington, E.; Chiodo, L.A.; Liu, L.X.; Sibley, D.R.; Roth, B.L.; Mailman, R. *Neuropsychopharmacology* **2003**, *28*, 1400-1411.
77. Berman, R.M.; Fava, M.; Thase, M.E.; Trivedi, M.H.; Swanink, R.; McQuade, R.D.; Carson, W.H.;

- Adson, D.; Taylor, L.; Hazel, J.; Marcus, R.N. *CNS Spectr.* **2009**, *14*, 197-206.
78. Mnie-Filali, O.; Lambás-Señas, L.; Zimmer, L.; Haddjeri, N. *Drug News Perspect.* **2007**, *20*, 613-618.
79. Mnie-Filali, O.; Lambás-Señas, L.; Scarna, H.; Haddjeri, N. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 1109-1117.
80. Nandam, L.S.; Jhaveri, D.; Bartlett, P. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 546-551.
81. Belmaker, R.H.; Agam, G. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 55-68.
82. Belenky, M.A.; Pickard, G.E. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *432*, 371-388.
83. Antle, M.C.; Ogilvie, M.D.; Pickard, G.E.; Mistlberger, R.E. *J. Biol. Rhythms* **2003**, *18*, 145-158.
84. Glass, J.D.; Grossman, G.H.; Farnbauch, L.; DiNardo, L. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 7451-7460.
85. Duncan, M.J.; Grear, K.E.; Hoskins, M.A. *Brain Res.* **2004**, *1008*, 40-48.
86. Sprouse, J.; Reynolds, L.; Li, X.; Braselton, J.; Schmidt, A. *Neuropharmacology* **2004**, *46*, 52-62.
87. Ehlen, J.C.; Grossman, G.H.; Glass, J.D. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5351-5357.
88. Duncan, M.J.; Short, J.; Wheeler, D.L. *Brain Res.* **1999**, *829*, 39-45.
89. Gardani, M.; Biello, S.M. *Neuroscience* **2008**, *152*, 245-253.
90. Monti, J.M.; Jantos, H. *Behav. Brain Res.* **2006**, *167*, 245-250.
91. Thomas, D.R.; Melotto, S.; Massagrande, M.; Gribble, A.D.; Jeffrey, P.; Stevens, A.J.; Deeks, N.J.; Eddershaw, P.J.; Fenwick, S.H.; Riley, G.; Stean, T.; Scott, C.M.; Hill, M.J.; Middlemiss, D.N.; Hagan, J.J.; Price, G.W.; Forbes, I.T. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 705-714.
92. Sarkisyan, G.; Hedlund, P.B. *Behav. Brain Res.* **2009**, *202*, 26-31.
93. Roberts, A.J.; Krucker, T.; Levy, C.L.; Slanina, K.A.; Sutcliffe, J.G.; Hedlund, P.B. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 1913-1922.
94. Pérez-García, G.S.; Meneses, A. *Behav. Brain Res.* **2005**, *163*, 136-140.
95. Meneses, A. *Behav. Brain Res.* **2004**, *155*, 275-282.
96. Pérez-García, G.; Meneses, A. *Behav. Brain Res.* **2009**, *202*, 102-113.
97. Terrón, J.A.; Falcón-Neri, A. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 609-616.
98. Terrón, J.A.; Martínez-García, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *560*, 56-60.
99. Hess, E.J. *Cell* **1996**, *87*, 1149-1151.
100. Rocha-González, H.I.; Meneses, A.; Carlton, S.M.; Granados-Soto, V. *Pain* **2005**, *117*, 182-192.
101. CATALYST 4.5; Molecular Simulations Inc.: San Diego, CA 92121-3752.
102. López-Rodríguez, M.L.; Porras, E.; Benhamú, B.; Ramos, J.A.; Morcillo, M.J.; Lavandera, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1097-1100.
103. López-Rodríguez, M.L.; Porras, E.; Morcillo, M.J.; Benhamú, B.; Soto, L.J.; Lavandera, J.L.; Ramos, J.A.; Olivella, M.; Campillo, M.; Pardo, L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5638-5650.
104. Norman, M.H.; Rigdon, G.C.; Navas, F., 3rd.; Cooper, B.R. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2552-2563.
105. Boar, B.R.; Oshea, D.M.; Tomlinson, I.D. *PCT. Int. Appl. WO9429272*, **1994**.

106. López-Rodríguez, M.L.; Benhamú, B.; Ayala, D.; Rominguera, J.L.; Murcia, M.; Ramos, J.A.; Viso, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3245-3253.
107. Montanari, F.; Passerini, R. *Boll. Fac. Chim. Ind. Bolog.* **1953**, *11*, 42-45.
108. Dandegaonker, S.H.; Revankar, G.R. *J. Karnatak Univ.* **1961**, *6*, 25-32.
109. Tallec, A. *Ann. Chim. Fr.* **1968**, *3*, 164.
110. Zablotskaya, A.; Segal, I.; Germane, S.; Shestakova, I.; Lukevics, E.; Kniess, T.; Spies, H. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, *16*, 550-555.
111. Cheng, Y.; Prusoff, W.H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
112. Medina, R.A.; Sallander, J.; Benhamú, B.; Porras, E.; Campillo, M.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M.L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2384-2392.
113. Cherezov, V.; Rosenbaum, D.M.; Hanson, M.A.; Rasmussen, S.G.F.; Thian, F.S.; Kobilka, T.S.; Choi, H.J.; Kuhn, P.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K.; Stevens, R.C. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
114. Rosenbaum, D.M.; Cherezov, V.; Hanson, M.A.; Rasmussen, S.G.F.; Thian, F.S.; Kobilka, T.S.; Choi, H.J.; Yao, X.J.; Weis, W.I.; Stevens, R.C.; Kobilka, B.K. *Science* **2007**, *318*, 1266-1273.
115. de la Fuente, T.; Martín-Fontecha, M.; Sallander, J.; Benhamú, B.; Campillo, M.; Medina, R.A.; Pellissier, L.P.; Claeysen, S.; Dumuis, A.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M.L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1357-1369.
116. Warne, T.; Serrano-Vega, M.J.; Baker, J.G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P.C.; Henderson, R.; Leslie, A.G.W.; Tate, C.G.; Schertler, G.F.X. *Nature* **2008**, *454*, 486-491.
117. Warne, T.; Moukhametzianov, R.; Baker, J.G.; Nehme, R.; Edwards, P.C.; Leslie, A.G.W.; Schertler, G.F.X.; Tate, C.G. *Nature* **2011**, *469*, 241-244.
118. Rasmussen, S.G.F.; Choi, H.J.; Fung, J.J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P.S.; Devree, B.T.; Rosenbaum, D.M.; Thian, F.S.; Kobilka, T.S.; Schnapp, A.; Konetzki, I.; Sunahara, R.K.; Gellman, S.H.; Pautsch, A.; Steyaert, J.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K. *Nature* **2011**, *469*, 175-180.
119. Rosenbaum, D.M.; Zhang, C.; Lyons, J.; Holl, R.; Aragao, D.; Arlow, D.H.; Rasmussen, S.G.F.; Choi, H.J.; Devree, B.T.; Sunahara, R.K.; Chae, P.S.; Gellman, S.H.; Dror, R.O.; Shaw, D.E.; Weis, W.I.; Caffrey, M.; Gmeiner, P.; Kobilka, B.K. *Nature* **2011**, *469*, 236-240.
120. Chien, E.Y.T.; Liu, W.; Zhao, Q.; Katritch, V.; Han, G.W.; Hanson, M.A.; Shi, L.; Newman, A.H.; Javitch, J.A.; Cherezov, V.; Stevens, R.C. *Science* **2010**, *330*, 1091-1095.
121. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G.W.; Kobayashi, T.; Stevens, R.C.; Iwata, S. *Nature* **2011**, *475*, 65-70.
122. Wacker, D.; Wang, C.; Katritch, V.; Han, G.W.; Huang, X.P.; Vardy, E.; McCorvy, J.D.; Jiang, Y.; Chu, M.; Siu, F.Y.; Liu, W.; Xu, H.E.; Cherezov, V.; Roth, B.L.; Stevens, R.C. *Science* **2013**, *340*, 615-619.
123. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-3717.
124. Gassman, P.G.; Bonser, S.M.; Mlinaric-Majerski, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2652-2662.
125. Cho, G.Y.; Remy, P.; Jansson, J.; Moessner, C.; Bolm, C. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3293-3296.
126. Glennon, R.A.; Slusher, R.M.; Lyon, R.A.; Titeler, M.; McKenney, J.D. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2375-2380.
127. Ferles, M.; Silhánková, A.; Kafka, S.; Taufmann, P.; Motáček, T. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **1983**, *48*, 1759-1764.

128. Anderson, A.; Beileli, D.; Bennett, D.J.; Buchanan, K.I.; Casula, A.; Cooke, A.; Feilden, H.; Gemmell, D.K.; Hamilton, N.M.; Hutchinson, E.J.; Lambert, J.J.; Maidment, M.S.; McGuire, R.; McPhail, P.; Miller, S.; Muntoni, A.; Peters, J.A.; Sansbury, F.H.; Stevenson, D.; Sundaram, H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3582-3591.
129. Mokrosz, M.J.; Mokrosz, J.L.; Duszynska, B.; Deren-Wesolek, A.; Klodzinska, A.; Kowalski, P.; Charakchieva-Minol, S.; Tatarczynska, E.; Kowalska, T.; Majka, Z.; Chojnacka-Wójcik, E.; Misztal, S. *Pharmazie* **1997**, *52*, 423-428.
130. <http://www.cerep.fr/Cerep/Users/index.asp>.
131. Hedlund, P.B.; Kelly, L.; Mazur, C.; Lovenberg, T.; Sutcliffe, J.G.; Bonaventure, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *487*, 125-132.
132. Canutescu, A.A.; Shelenkov, A.A.; Dunbrack, R.L. Jr. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2001-2014.
133. Martí-Renom, M.A.; Stuart, A.C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Sali, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291-325.
134. Pardo, L.; Deupi, X.; Dolker, N.; López-Rodríguez, M.L.; Campillo, M. *ChemBioChem.* **2007**, *8*, 19-24.
135. Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M.C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999-2012.
136. Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
137. Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E.I.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Merz, K.M.; Pearlman, D.A.; Crowley, M.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Wu, X.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Mathews, D.H.; Schafmeister, C.; Ross, W.S.; Kollman, P.A. *AMBER 9*; University of California: San Francisco, 2006.
138. Jongejan, A.; Bruysters, M.; Ballesteros, J.A.; Haaksma, E.; Bakker, R.A.; Pardo, L.; Leurs, R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 98-103.

CAPÍTULO B
NUEVOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₆

B.1. INTRODUCCIÓN

B.1.1. EL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT₆

El receptor 5-HT₆ (5-HT₆R) constituye la más reciente aportación a la familia de receptores de serotonina. Fue identificado por primera vez en 1993 por dos grupos de investigación de forma independiente^{1,2} tras descifrar una secuencia de ADN complementario (ADNc) en rata, que codificaba un receptor sensible a 5-HT con una farmacología nueva. Posteriormente, Kohen et al.^{3,4} describieron la clonación del 5-HT₆R humano (h5-HT₆R), cuyo ADNc codifica un polipéptido de 440 aminoácidos (Figura 1) y que presenta un 89% de homología con los receptores de rata.

El gen del 5-HT₆R se localiza en la región del cromosoma 1p35-p36 humano. Su estructura génica consta de un extremo carboxilo terminal moderadamente

largo, un tercer bucle intracelular corto y dos intrones, uno en el tercer bucle intracelular y otro en el tercer bucle extracelular.³

En cuanto al mecanismo de transducción implicado en la activación del 5-HT₆R, se ha demostrado que su acoplamiento positivo a la adenilato ciclasa (AC) induce un aumento en la producción de AMP cíclico (AMPc).⁵⁻⁷ El 5-HT₆R activa la cascada de la AC mediante el acoplamiento de los aminoácidos del tercer bucle intracelular a la subunidad G α_s .^{8,9} Por tanto, al igual que todos los receptores serotoninérgicos, excepto el 5-HT₃, el 5-HT₆R es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptor*, GPCRs) y presenta una estructura monomérica de siete dominios transmembrana en forma de hélice, de 20 a 28 aminoácidos cada uno.

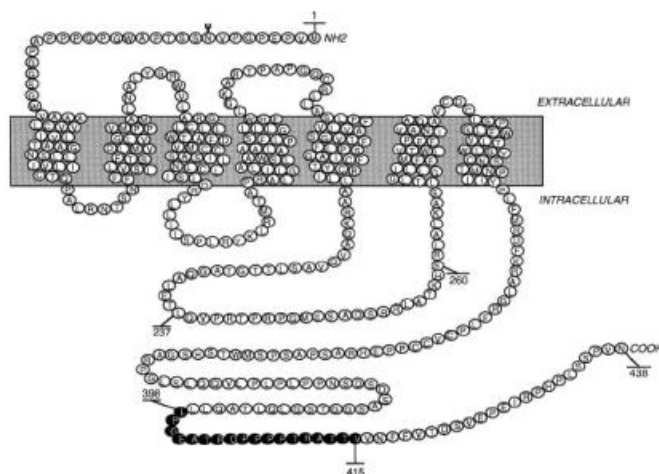


Figura 1. Secuencia primaria del 5-HT₆R (fuente: *Brain Res.* 1997, 746, 207-219).

Una característica particular del 5-HT₆R con respecto a los demás miembros de la familia serotoninérgica es su localización casi exclusiva en el sistema nervioso central (SNC). La ausencia durante los primeros años de un radioligando potente y selectivo del 5-HT₆R dificultó el estudio de su distribución,

determinada fundamentalmente mediante hibridación *in situ*,^{2,10} y análisis de ARNm (ensayos *Northern Blot*),^{1,2} así como ensayos inmunohistoquímicos.^{11,12} Estos estudios, realizados en cerebro de rata o humano, han coincidido en detectar una elevada densidad del ARNm del 5-HT₆R en el tubérculo olfativo, el cuerpo estriado,

el núcleo accumbens y el hipocampo. Asimismo, se encuentran concentraciones inferiores en el cerebelo, la amígdala y algunas zonas de la corteza cerebral. Más recientemente, ensayos

autorradiográficos con el radioligando específico del 5-HT₆R [¹²⁵I]SB-258585¹³⁻¹⁵ han confirmado en esencia la distribución de este receptor en el SNC, descrita previamente (Figura 2).

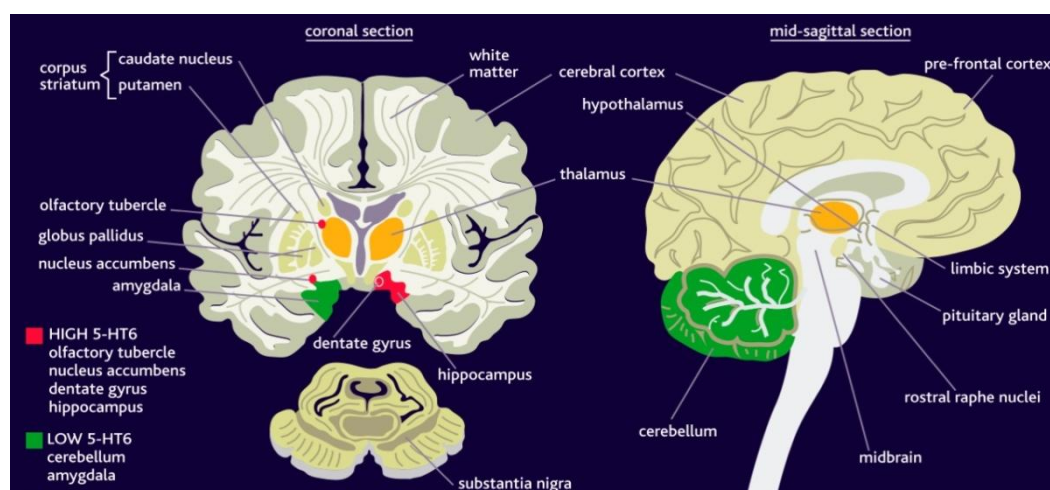


Figura 2. Distribución del h5-HT₆R en el SNC (fuente: CNSforum).

Es importante destacar que, a pesar de la extensa investigación realizada en el 5-HT₆R durante la década pasada y de que no se le conocen isoformas, su papel funcional permanece ambiguo, ya que se han encontrado numerosos resultados contradictorios desde el comienzo de su caracterización neurofarmacológica hasta la actualidad.

Recientemente, se han intentado analizar las claves que podrían haber originado esta inconsistencia en la farmacología del 5-HT₆R.¹⁶ Entre ellas, cabe mencionar las discrepancias en los datos de afinidad de los ligandos debido al uso de diferentes radioligandos, tanto no selectivos ([³H]LSD y [³H]-5-HT) como selectivos ([³H]Ro 63-0563 y [¹²⁵I]SB-258585); las divergencias en la definición de un ligando como antagonista silencioso, agonista o agonista inverso, dependiendo de la densidad de los receptores 5-HT₆ en los diferentes tejidos cerebrales del ensayo; por último, la escasa información acerca

de la selectividad y de las propiedades farmacocinéticas de los ligandos, que dificulta el entendimiento de las diferencias observadas en los perfiles de comportamiento in vivo.

B.1.2. LIGANDOS 5-HT₆. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La elevada afinidad de los agentes antipsicóticos y antidepresivos clásicos^{1,3,11} por el recién descubierto receptor serotoninérgico 5-HT₆ encaminaron los primeros estudios hacia la exploración de su potencial como diana terapéutica para el tratamiento de la esquizofrenia y el trastorno afectivo bipolar. Sin embargo, los resultados se mostraron contradictorios y no arrojaron ninguna conclusión para estas indicaciones terapéuticas.¹⁷

No fue hasta finales de los años 1990 cuando se descubrieron los primeros ligandos del 5-HT₆R, empleando programas de cribado de alta productividad

(*high throughput screening*, HTS) de librerías de compuestos de las compañías farmacéuticas Roche y SmithKline Beecham. Así, los antagonistas Ro 04-6790,¹⁸ Ro 63-0563¹⁸ (Figura 3) y SB-271046¹⁹ (Figura 4) se convirtieron en importantes herramientas farmacológicas para explorar las posibles implicaciones terapéuticas del receptor.

Asimismo, Glennon et al.²⁰⁻²³ y la compañía farmacéutica Merck Sharp & Dohme²⁴ identificaron una nueva clase estructural de compuestos derivados de indol, entre los que destacan el primer agonista selectivo del 5-HT₆R, EMDT,²² y el antagonista MS-245²³ (Figura 3).

A lo largo de la pasada década, el número de publicaciones y patentes anuales en el área del 5-HT₆R ha crecido vertiginosamente, fruto de una intensa investigación tanto en el ámbito industrial como académico, que ha proporcionado el descubrimiento y desarrollo de una gran variedad de ligandos,^{17,25-31} entre los que destacan WAY-181187 (Figura 4), E-6801 y SB-357134 (Figura 3). La mayoría de ellos han sido caracterizados como antagonistas y a día de hoy aún no existe una diferenciación clara en la estructura ni en las aplicaciones terapéuticas entre los antagonistas y los escasos agonistas 5-HT₆ descritos, en parte quizá debido a las inconsistencias encontradas en la caracterización farmacológica del receptor^{16,32} (véase apartado B.1.1).

Paralelamente a la proliferación de nuevos ligandos, se descubrió la influencia del 5-HT₆R en la neurotransmisión colinérgica,^{33,34} lo que ha propiciado un gran número de estudios acerca de su posible implicación en los trastornos cognitivos de memoria y aprendizaje, causantes de enfermedades neurológicas como el Alzheimer y otras demencias.^{17,27,30,35-44} Más recientemente, se ha demostrado que los ligandos

selectivos de este receptor reducen el apetito, si bien este efecto había pasado desapercibido en los estudios iniciales. Así, en los últimos años, el 5-HT₆R ha emergido como una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico,^{17,27,28,45} enfermedad de creciente prevalencia en la actualidad y con una urgente demanda farmacológica.

B.1.2.1. Trastorno cognitivo. Enfermedad de Alzheimer

Antes incluso de la identificación de los primeros ligandos del 5-HT₆R, quedó demostrada la implicación de este receptor en la modulación de la función o disfunción cognitiva. En primer lugar, su expresión era elevada en regiones del cerebro relacionadas con el aprendizaje y la memoria, en particular el hipocampo, la corteza y la amígdala.¹¹ Asimismo, los efectos de comportamiento en rata producidos tras la administración de oligonucleótidos antisentido del receptor eran revertidos por atropina, lo que le confería un papel importante en el control de la neurotransmisión colinérgica.³³

Con la aparición del primer antagonista 5-HT₆, se demostró que Ro 04-6790 (Figura 3) era capaz de producir el mismo efecto.¹⁸ Debido a la relación entre las funciones colinérgica y cognitiva, enseguida se especuló que los receptores 5-HT₆ podían estar implicados en los trastornos cognitivos y de la memoria.^{46,47} Estudios posteriores han cuestionado que los antagonistas 5-HT₆ incrementen la transmisión colinérgica,^{48,49} si bien como veremos a continuación el potencial terapéutico de los ligandos del 5-HT₆R en el tratamiento de trastornos cognitivos se presenta muy prometedor, desconociéndose por el momento su mecanismo de acción.

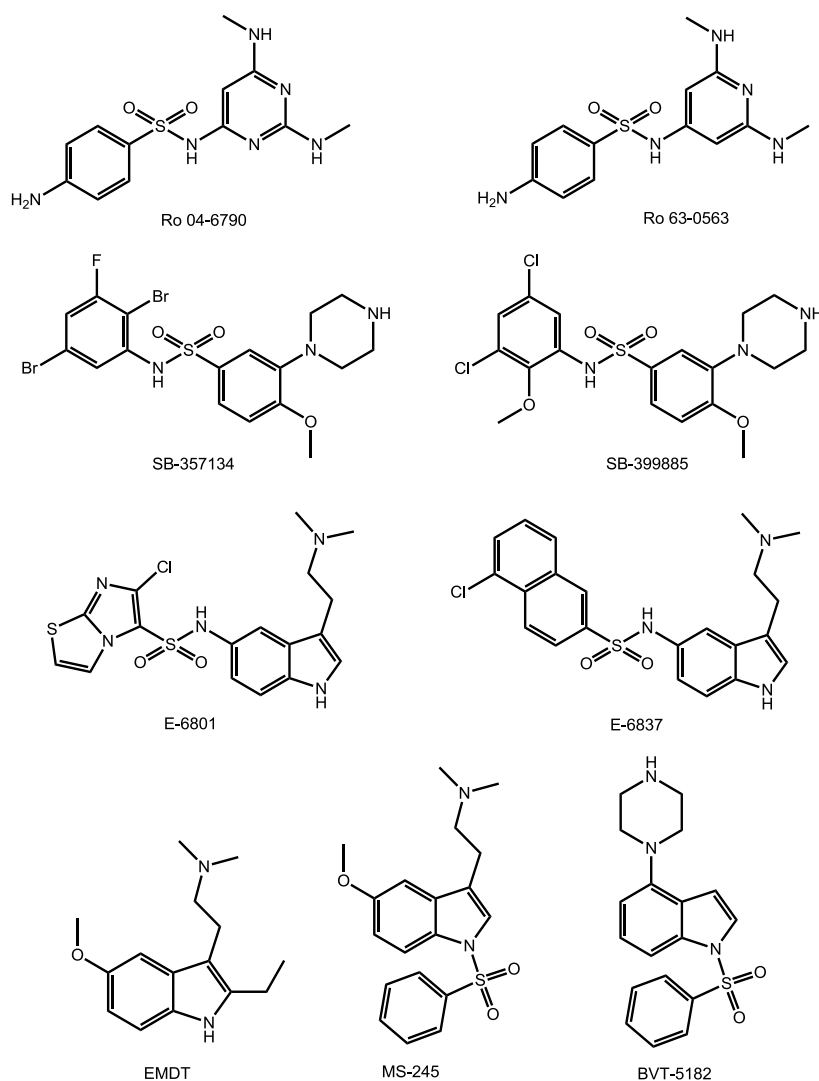


Figura 3. Agonistas y antagonistas representativos del receptor serotoninérgico 5-HT₆.

En efecto, numerosos ensayos farmacológicos in vivo confirman que la administración de los antagonistas Ro 04-6790,^{46,50-52} SB-271046,^{47,51,53-55} SB-399885,^{56,57} Lu-AE-58054⁵⁸ o GSK-742457,⁵⁹ así como del agonista E-6801⁶⁰ (Figuras 3 y 4) contribuye a mejorar el aprendizaje y el desarrollo de la memoria. La mayoría de ellos no tienen efecto en el aprendizaje per se, pero inducen una notable mejoría en la

consolidación de conocimientos y en la recuperación de la amnesia provocada por el agente anticolinérgico escopolamina.

En vista de las evidencias obtenidas del beneficioso papel que los antagonistas 5-HT₆ juegan en los trastornos cognitivos y la disfunción de la memoria, los estudios actuales están enfocados en la esquizofrenia, trastorno psicótico que cursa con

síntomas cognitivos, así como en la enfermedad de Alzheimer, proceso neurodegenerativo que se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y que se manifiesta fundamentalmente a edades avanzadas.^{30,37,38,44,61} Así, tras los prometedores resultados preclínicos se ha demostrado la tolerancia y la eficacia clínica de algunos antagonistas 5-HT₆ en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (véase apartado B.1.2.3). Sólo la consecución de estos ensayos clínicos revelará si los ligandos del 5-HT₆R representan una alternativa real a los escasos fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, uno de los mayores retos de este siglo en salud pública.

B.1.2.2. Control del apetito. Obesidad y síndrome metabólico

Fone et al. fueron los primeros en observar que tanto los oligonucleótidos antisentido del 5-HT₆R como el antagonista Ro 04-6790 (Figura 3) provocaban una disminución de la ingesta en ratas sometidas a un régimen de alimentación fijo.⁶² Estos sugerentes resultados preliminares desencadenaron amplios estudios farmacológicos dirigidos a explorar la implicación del 5-HT₆R en el control del apetito, los cuales continúan llevándose a cabo en la actualidad.

En el año 2000, los experimentos genéticos llevados a cabo por la compañía Biovitrum constituyeron la primera evidencia de que el 5-HT₆R era una diana terapéutica importante para el desarrollo de nuevos agentes anti-obesidad.⁶³ Así, Caldirola⁶⁴ observó que los ratones *knockout* 5-HT₆ eran resistentes a la obesidad cuando se les administraba una dieta rica en grasas. Posteriormente, numerosos ensayos in vivo en ratones y ratas han demostrado que los antagonistas 5-HT₆ BVT-5182,⁶⁵ SB-271046⁶⁵ y PRX-07034⁶⁶ (Figuras 3 y 4), así como el agonista parcial E-6837⁶⁷ (Figura 3) inducen una disminución de

la ingesta y una notable pérdida de peso provocadas por un incremento en la saciedad, sin que se hayan observado efectos secundarios en la actividad motora ni náuseas o molestias gastrointestinales.

Más aún, en modelos animales predictivos de obesidad, la pérdida de peso viene acompañada de una disminución de la adiposidad y de los niveles de glucosa. Estos efectos beneficiosos hacen de los ligandos del 5-HT₆R unos candidatos muy prometedores como fármacos para el tratamiento de la obesidad y el denominado síndrome metabólico asociado, que incluye la diabetes tipo 2 y constituye una de las enfermedades con mayor urgencia farmacológica en la actualidad. Los ensayos clínicos en desarrollo así lo están corroborando (véase apartado B.1.2.3).

B.1.2.3. Ligandos 5-HT₆ en desarrollo clínico

Según la información recogida en la base de datos *Integrity* de *Thomson Reuters* (https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_home.util_home, revisada en abril 2012), diversos ligandos del 5-HT₆R han sido sometidos a ensayos clínicos, fundamentalmente para el tratamiento del trastorno cognitivo en la esquizofrenia o el Alzheimer y/o de la obesidad (Tabla 1).

En la actualidad, nueve de ellos continúan su desarrollo clínico como candidatos a fármacos y el compuesto [¹¹C]GSK-215083 como marcador de PET para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, ningún ligando 5-HT₆ ha sido comercializado aún y el entusiasmo inicial de los ensayos clínicos ha dejado paso a un creciente pesimismo debido a los desalentadores resultados obtenidos hasta la fecha. En este sentido, la investigación de éstos y nuevos ligandos 5-HT₆ permitirá demostrar la utilidad real de esta nueva clase de compuestos de elevado potencial terapéutico, para el tratamiento de enfermedades tan relevantes como el Alzheimer, la esquizofrenia o la obesidad.

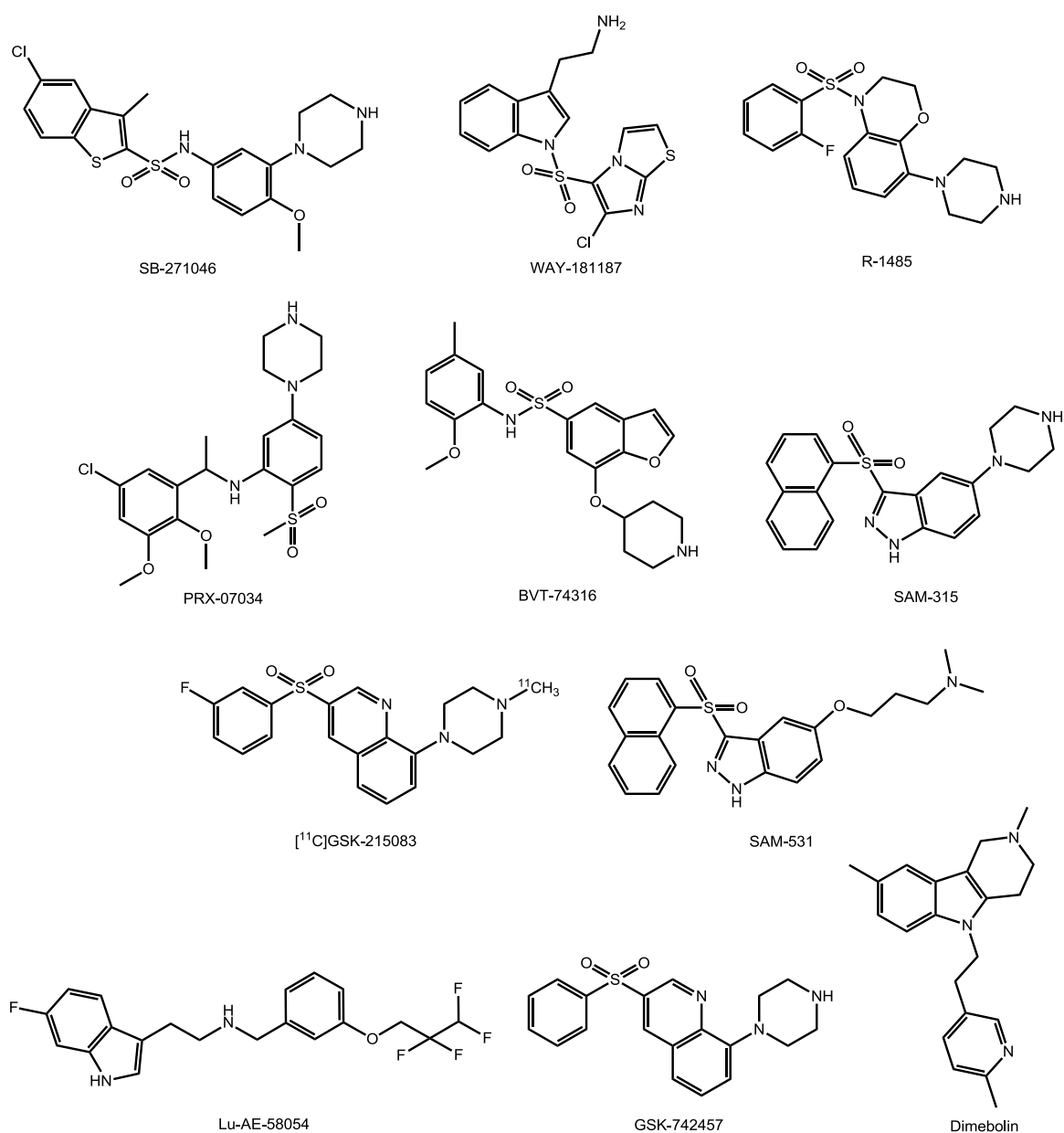


Figura 4. Estructuras disponibles de los ligandos 5-HT₆ sometidos a desarrollo clínico.

Tabla 1. Ligandos 5-HT₆ sometidos a desarrollo clínico

Ligando	Estructura	Compañía farmacéutica	Fase clínica	Funcionalidad	Indicación terapéutica
SB-271046	Figura 4	GlaxoSmithKline	Fase I	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia
WAY-181187 (SAX-187)	Figura 4	Wyeth ^a	Fase I	Agonista	Ansiedad
R-1485	Figura 4	Roche	Fase I	Antagonista	Alzheimer
PRX-07034	Figura 4	Epix Pharmaceuticals	Fase I	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia Obesidad
BVT-74316	Figura 4	Biovitrum	Fase I	Antagonista	Obesidad
SAM-315	Figura 4	Wyeth ^a	Fase I	Antagonista	Alzheimer
SYN-114	No disponible	Roche ^b	Fase I ^e	Antagonista	Trastorno cognitivo
AVN-322	No disponible	Avineuro	Fase I ^e	Antagonista	Alzheimer
SYN-120	No disponible	Roche ^b	Fase I ^e	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia
PF-05212377 (SAM-760)	No disponible	Pfizer	Fase I ^e	Antagonista	Alzheimer
[¹¹ C]GSK-215083	Figura 4	GlaxoSmithKline	Fase I ^e	Antagonista	Alzheimer (diagnóstico)
SUVN-502	No disponible	Suven Life Sciences	Fase II ^e	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia
SAM-531	Figura 4	Pfizer	Fase II (discontinuado)	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia
Lu-AE-58054 (LY-483518, SGS-518)	Figura 4	Lundbeck ^c	Fase II ^e	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia (discontinuado)
GSK-742457 (SB-742457)	Figura 4	GlaxoSmithKline	Fase IIb ^e	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia (Fase I)
AVN-211	No disponible	Avineuro	Fase II ^e	Antagonista	Alzheimer Esquizofrenia
Dimebolin (PF-01913539) ^d	Figura 4	Pfizer	Fase III ^e	Antagonista	Alzheimer Huntington (discontinuado)

^a Ahora Pfizer; ^b desarrollado en Biotie Therapeutics; ^c originalmente de Lilly, licenciado en Saegis, adquirida por Lundbeck; ^d comercializado en 1983 por la Academia Rusa de las Ciencias con el nombre de latrepirdina, como antihistamínico para el tratamiento de procesos alérgicos; ^e continúa su desarrollo clínico.

B.2. RESULTADOS PREVIOS Y OBJETIVOS

Como se ha expuesto anteriormente, los ligandos del 5-HT₆R presentan una prometedora aplicabilidad terapéutica en enfermedades como el Alzheimer, la esquizofrenia o la obesidad. En este contexto, hace unos años nuestro grupo de investigación se sumó al interesante reto de desarrollar nuevos ligandos 5-HT₆ que pudieran representar agentes terapéuticos y/o herramientas farmacológicas para un mejor conocimiento del receptor.

Desde la aparición de los primeros ligandos en 1998 hasta el comienzo de nuestro proyecto, la mayoría de ellos habían sido identificados mediante HTS de librerías de compuestos. Con el objetivo de identificar nuevos *hits* desde un abordaje racional, nuestro punto de partida consistió en la elaboración de un modelo 3D de farmacóforo para el reconocimiento de antagonistas por el 5-HT₆R (Figura 5).⁶⁸ A partir de este modelo, se diseñaron dos series de compuestos de estructuras generales I y II en los que el sistema

aromático (AR) es un esqueleto principal de bencimidazol, en el que se distribuye el resto de elementos farmacofóricos (PI, HBA y HYD) (Figura 5). Ambas series se han desarrollado simultáneamente, constituyendo los resultados obtenidos en la serie II el trabajo de la Tesis Doctoral de Tania de la Fuente Mendizábal.⁶⁸⁻⁷⁰ En la serie II, después de los procesos de identificación de *hit(s)*, *hit to lead* y optimización del *lead*, se ha desarrollado el compuesto UCM-258, caracterizado como un potente antagonista del 5-HT₆R ($K_b = 5$ nM). En el presente capítulo se pretende llevar a cabo un trabajo análogo de desarrollo de la serie I.

La consecución de este objetivo se abordará a través de las siguientes etapas:

1. Síntesis de los compuestos de estructura general I y determinación del perfil de afinidad por el h5-HT₆R (identificación de *hit(s)*).
2. Proceso *hit to lead* (síntesis, perfil de afinidad, caracterización funcional y propiedades farmacocinéticas).
3. Actividad farmacológica.

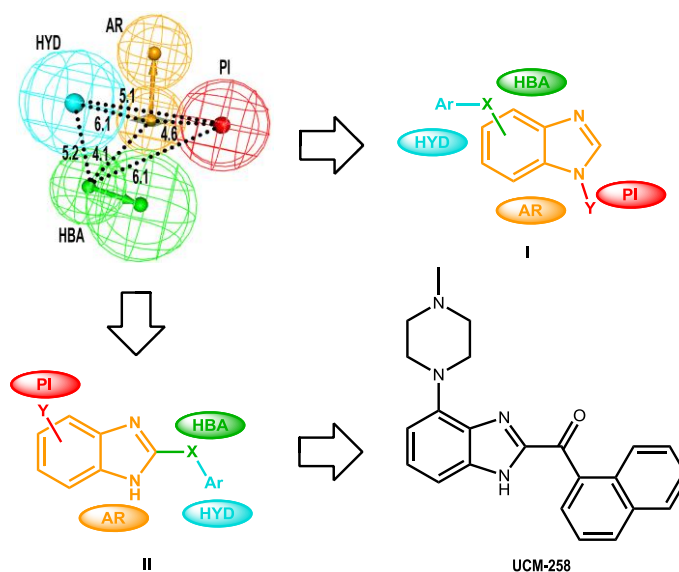


Figura 5. Estructuras generales I y II diseñadas a partir del modelo de farmacóforo para antagonistas del 5-HT₆R.

B.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

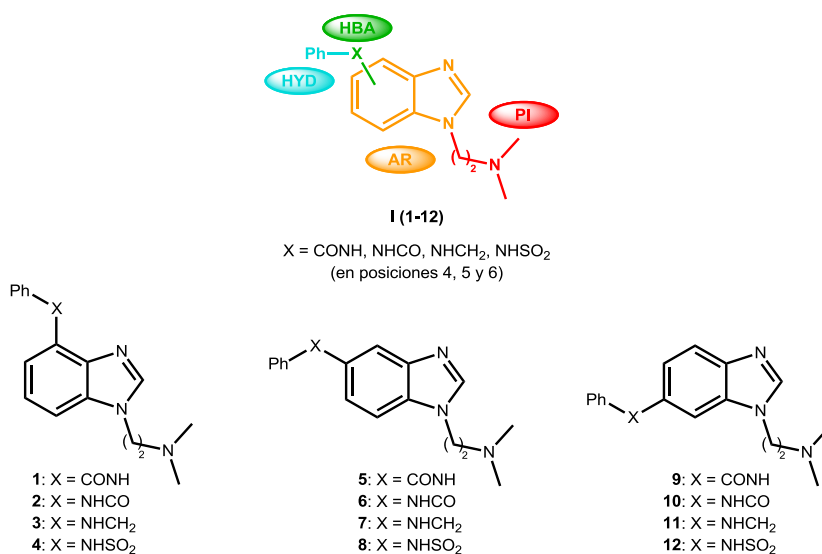
B.3.1. BÚSQUEDA DE *HITS* EN UNA SERIE INICIAL DE COMPUESTOS **I** (1-12)

De acuerdo con el primer objetivo propuesto en el presente capítulo, se planteó la síntesis de una serie inicial de nuevos derivados de bencimidazol de estructura general **I** (Esquema 1) en los que el centro PI es un sustituyente *N,N*-dimetilaminoetilo (de acuerdo con la distancia entre el centro aromático y el nitrógeno básico en el farmacóforo) y como elemento HBA se han seleccionado diferentes grupos funcionales X (CONH, NHCO, NHCH₂, NHSO₂), unidos a su vez a un

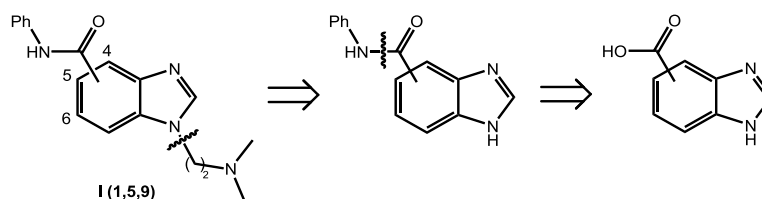
anillo de benceno como elemento HYD. Las subunidades X-Ph (HBA-HYD) se han dispuesto en las posiciones 4, 5 ó 6 del bencimidazol, lo que les proporciona diferentes orientaciones respecto del resto de elementos farmacofóricos.

Para la obtención de los compuestos **1-12**, en un principio se consideraron diferentes rutas sintéticas según la naturaleza del grupo funcional X.

La síntesis de los compuestos finales **1**, **5** y **9** (X = CONH) se planteó según el Esquema 2, que implica la formación de la amida del ácido bencimidazolcarboxílico correspondiente y la posterior alquilación del nitrógeno de la posición 1 del anillo de bencimidazol.



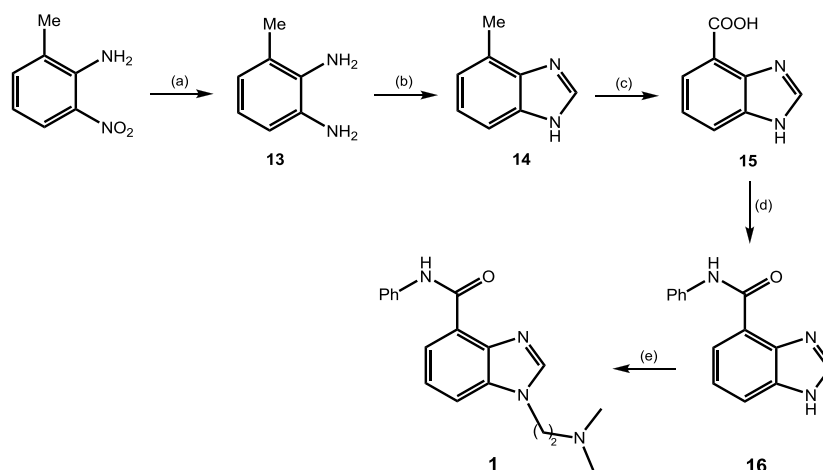
Esquema 1



Esquema 2

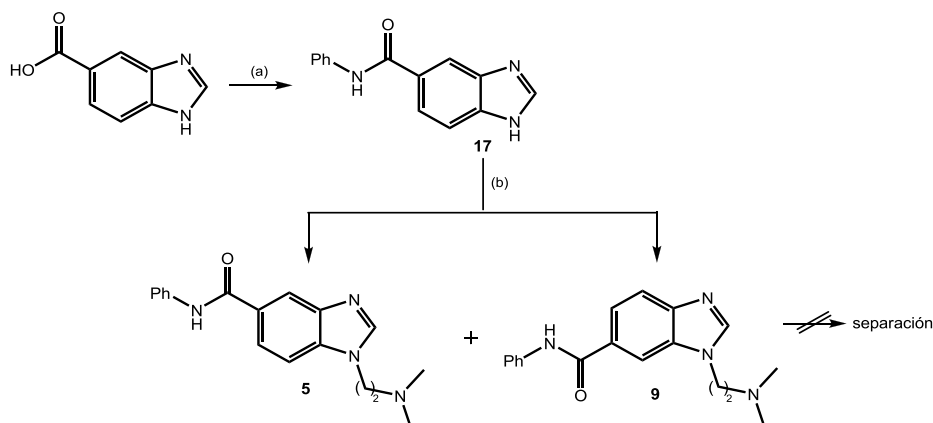
Así, la preparación del compuesto **1** se ha llevado a cabo a partir de 2-metil-6-nitroanilina (Esquema 3). Por hidrogenación catalítica de ésta, ciclación de Phillips con ácido fórmico y posterior oxidación de **14** con permanganato potásico, se preparó el ácido 4-bencimidazolcarboxílico **15**.⁷¹ El tratamiento de **15** con cloruro de tionilo y posterior condensación del cloruro de ácido con anilina dio lugar a la amida **16**, cuya

alquilación con 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina proporcionó el derivado deseado **1** como único regioisómero. En el caso de la amida **17**, resultante de la condensación del ácido 5-bencimidazolcarboxílico comercial, la reacción de alquilación dio lugar a la mezcla de los dos posibles regioisómeros **5** y **9**, en proporción 1:1 (Esquema 4). Los intentos de separación de ambos compuestos finales resultaron infructuosos.



Reactivos: (a) H_2 / $\text{Pd}(\text{C})$, MeOH , t.a., 15 h, 85%. (b) HCOOH , H_2O , reflujo, 3-6 h, 70%. (c) KMnO_4 , H_2O , reflujo, 7 h, 35%. (d) (1) SOCl_2 , tolueno, reflujo, 5 h; (2) PhNH_2 , tetrahidrofurano, t.a., 15 h, 71%. (e) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , NaI , dimetilformamida, 60 °C, 15 h, 50%.

Esquema 3

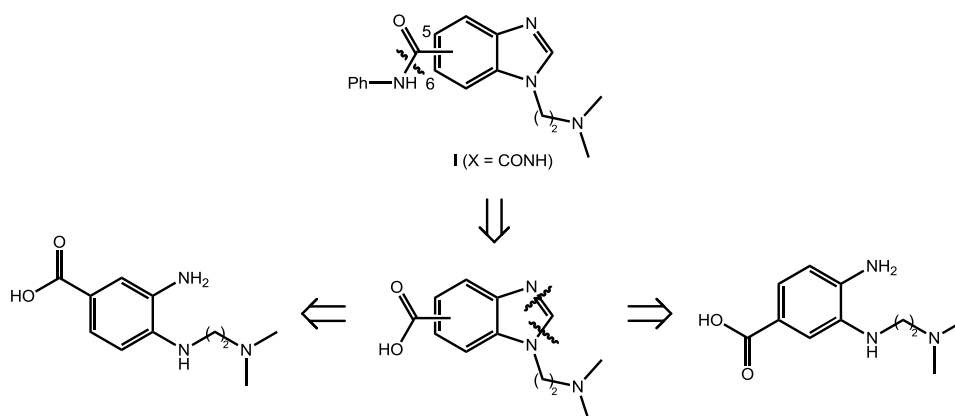


Reactivos: (a) (1) SOCl_2 , tolueno, reflujo, 5 h; (2) PhNH_2 , tetrahidrofurano, t.a., 15 h, cuantitativa. (b) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , NaI , dimetilformamida, 60 °C, 15 h.

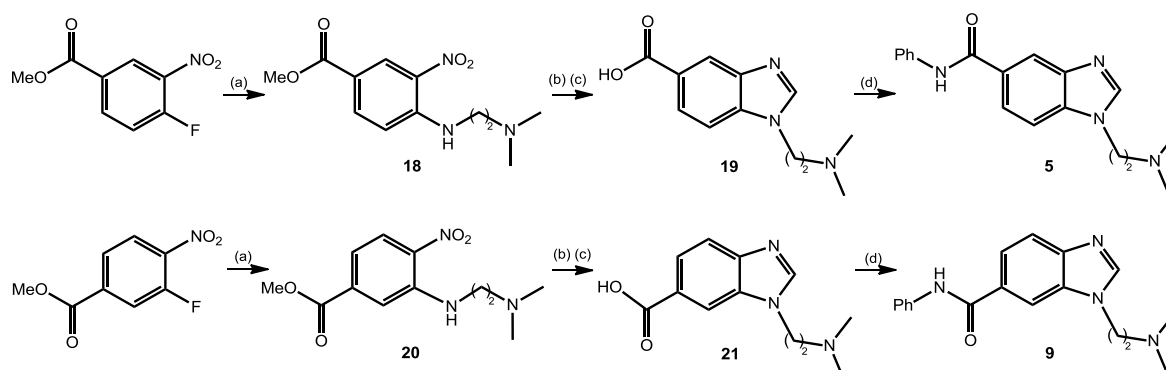
Esquema 4

Para poder acceder a los compuestos finales **5** y **9** por separado, se consideró una ruta sintética alternativa en la que la ciclación de sendas bencenodiaminas *N*-alquiladas eliminaría la posibilidad de obtener los isómeros derivados de bencimidazol (Esquema 5). En primer lugar se llevó a cabo la introducción de la cadena alquílica por sustitución nucleófila aromática de 4-fluoro-3-nitrobenzoato y 3-fluoro-4-nitrobenzoato de metilo, con *N,N*-

dimetiletilendiamina (Esquema 6). A continuación, los anillos de bencimidazol se construyeron mediante la reacción “one pot” de ciclación reductora⁷² por tratamiento de **18** y **20** con ácido fórmico en presencia de Pd(C). Finalmente, la condensación de **19** y **21** con anilina, en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), proporcionó los compuestos deseados **5** y **9**, respectivamente (Esquema 6).



Esquema 5

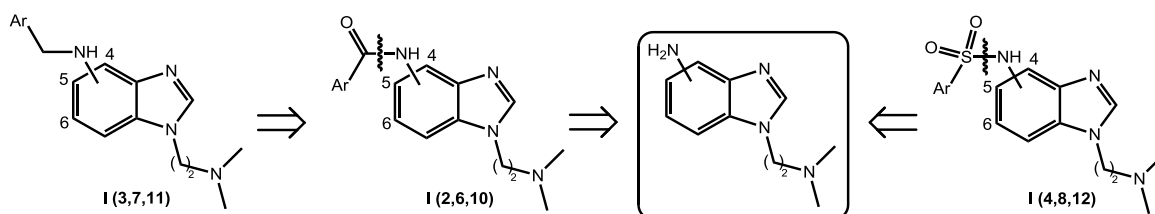


Reactivos: (a) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, K_2CO_3 , dimetilformamida, 90 °C, 12 h, 65-71%. (b) Pd(C) 10%, HCOOH , MeOH, reflujo, 15 h, 80-85%; (c) NaOH, MeOH, H_2O , reflujo, 2 h, cuantitativo. (d) PhNH_2 , HOBt, EDC, dimetilformamida, 20 °C, 3 h, 62-63%.

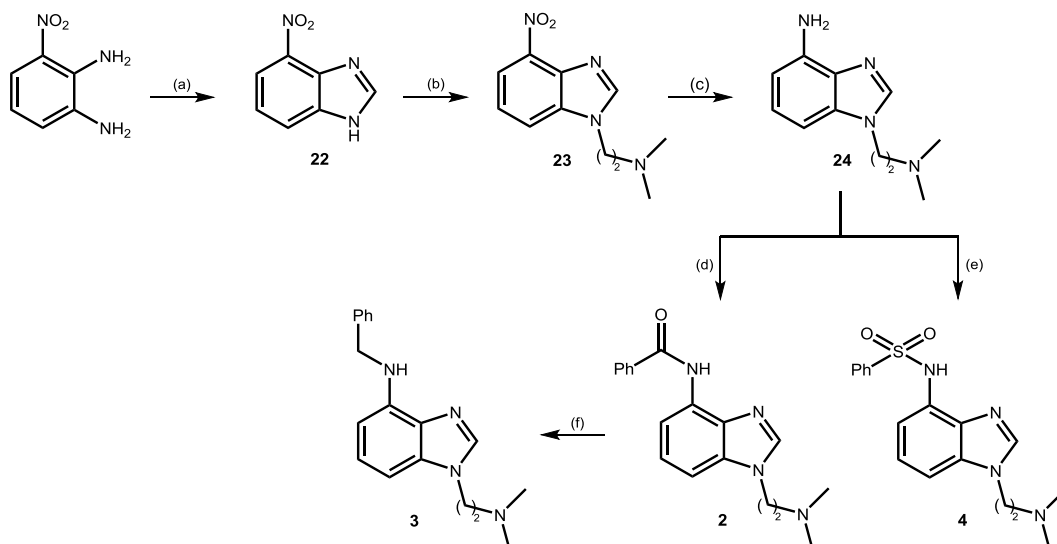
Esquema 6

Por otro lado, la ruta sintética general para la obtención de los compuestos finales con $X = \text{NHCO}$, NHCH_2 y NHSO_2 se planteó a partir del correspondiente aminobencimidazol *N*-alquilado, según se describe en el Esquema 7. Así, la síntesis de 1-[2-(dimetilamino)etil]-4-aminobencimidazol (**24**), necesario para obtener los compuestos **2-4**, se llevó a cabo por ciclación de Phillips de 3-nitrobenzo-1,2-diamina,⁷³ seguida de la alquilación del nitrógeno del anillo de

bencimidazol, separación cromatográfica de los regioisómeros resultantes (con el grupo nitró en posiciones 4 y 7, obtenidos en proporción 6:4, respectivamente) y posterior reducción del grupo nitró. Por tratamiento de **24** con ácido benzoico y cloruro de benenosulfonilo, se obtuvieron los compuestos finales **2** y **4**, respectivamente. La reducción de la amida **2** con hidruro de litio y aluminio dio lugar al compuesto final **3** (Esquema 8).



Esquema 7

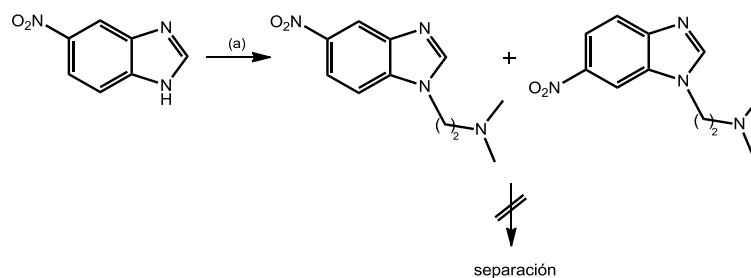


Reactivos: (a) HCOOH , H_2O , reflujo, 3-6 h, cuantitativa. (b) (i) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{HCl}$, K_2CO_3 , NaI , dimetilformamida, 60°C , 15 h; (ii) separación cromatográfica, 33%. (c) H_2 / $\text{Pd}(\text{C})$ 10%, MeOH , t.a., 15 h, cuantitativa. (d) PhCOOH , HOBt , EDC , dimetilformamida, 20°C , 3 h, 89%. (e) PhSO_2Cl , Et_3N , tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 90%. (f) LiAlH_4 , tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 97%.

Esquema 8

Para la obtención de los compuestos finales sustituidos en posiciones 5 y 6 (**6-8,10-12**), en la reacción de 5-nitrobencimidazol comercial con 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina, se obtuvo la mezcla de regioisómeros *N*₁- y *N*₃-alquilados, cuyos intentos de separación fueron infructuosos (Esquema 9). Por tanto, fue necesario diseñar una metodología análoga a la recogida en el Esquema 6, en la que la ciclación

permite obtener cada uno de los regioisómeros deseados (Esquemas 10 y 11). El primer paso de esta ruta sintética consiste en la sustitución nucleófila del fluorobenceno adecuado con *N,N*-dimetiletilendiamina. Esta sustitución requiere la presencia de un grupo nitro en posición *orto/para* respecto del átomo de flúor, como grupo electroattractivo que active el anillo para el ataque nucleófilo.

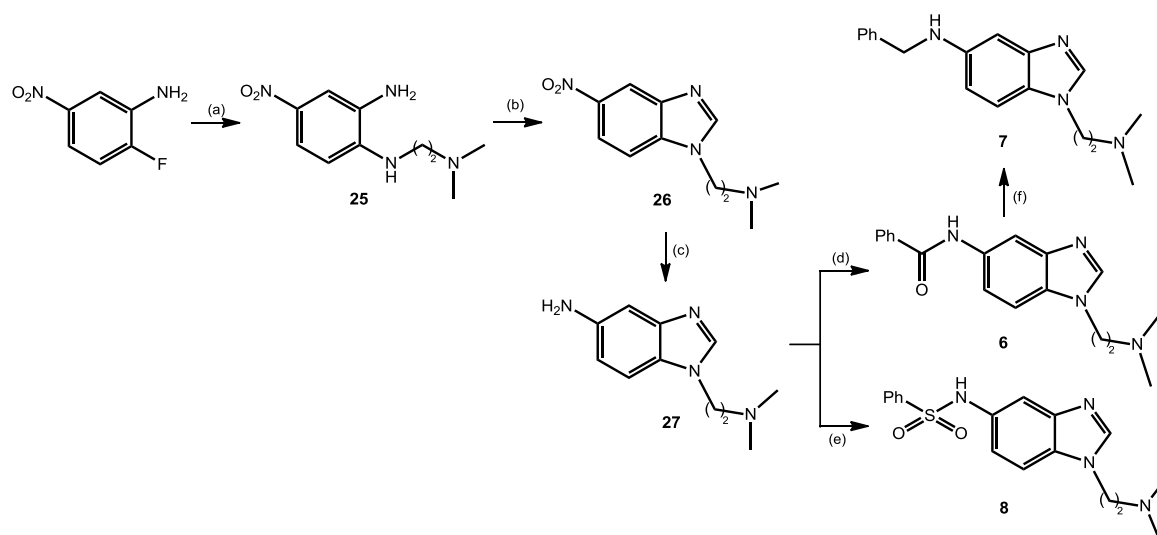


Reactivos: (a) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , NaI, dimetilformamida, 60 °C, 15 h, 73%.

Esquema 9

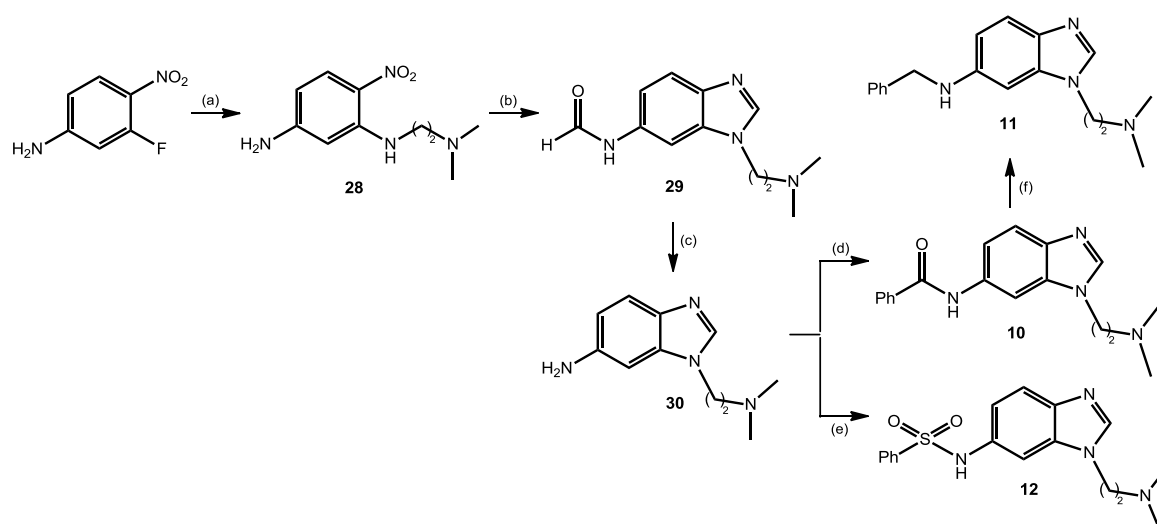
Teniendo en cuenta estos requisitos, se seleccionaron 2-fluoro-5-nitroanilina (Esquema 10) y 3-fluoro-4-nitroanilina (Esquema 11) como reactivos de partida comerciales. Así, a partir de la primera, por sustitución, ciclación, reducción y condensación, se obtuvieron los compuestos finales **6** ($\text{X} = \text{NHCO}$) y **8** ($\text{X} = \text{NHSO}_2$). Finalmente, la reducción de **6** proporcionó la bencilamina **7** ($\text{X} = \text{NHCH}_2$) (Esquema 10). Análogamente, la sustitución de 3-fluoro-4-nitroanilina

con *N,N*-dimetiletilendiamina dio lugar al compuesto **28**, cuya ciclación reductora “*one pot*” conllevó la formilación del grupo amino. Tras la hidrólisis del grupo formilo del derivado de bencimidazol **29** y la condensación de **30** con ácido benzoico, se obtuvo el compuesto deseado **10** ($\text{X} = \text{NHCO}$), cuya reducción proporcionó el análogo **11** ($\text{X} = \text{NHCH}_2$). La reacción de **30** con cloruro de bencenosulfonilo en piridina permitió la obtención del compuesto final **12** ($\text{X} = \text{NHSO}_2$) (Esquema 11).



Reactivos: (a) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, K_2CO_3 , dimetilformamida, 90°C , 12 h, 78%. (b) HCOOH , H_2O , 3-6 h, reflujo, 92%. (c) H_2 / $\text{Pd}(\text{C})$ 10%, MeOH, 15 h, t.a., cuantitativo. (d) PhCOOH , HOBt, EDC, dimetilformamida, 20°C , 3 h, 83%. (e) PhSO_2Cl , Et_3N , tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 71%. (f) LiAlH_4 , tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 93%.

Esquema 10



Reactivos: (a) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, K_2CO_3 , dimetilformamida, 90°C , 12 h, 60%. (b) $\text{Pd}(\text{C})$ 10%, HCOOH , MeOH, reflujo, 15 h, 69%. (c) H_2SO_4 4 M, tetrahidrofurano, 50°C , 1 h, 99%. (d) PhCOOH , HOBt, EDC, dimetilformamida, t.a., 3 h, 80%. (e) PhSO_2Cl , piridina, diclorometano, t.a., 15 h, 25%. (f) LiAlH_4 , tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 90%.

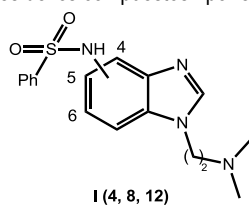
Esquema 11

Una vez sintetizados los compuestos de estructura general **I** (**1-12**), se ha determinado su afinidad por el receptor serotoninérgico 5-HT₆. Los estudios bioquímicos se han realizado mediante experimentos de desplazamiento de radioligando in vitro en células HEK-293 transfectadas con el h5-HT₆R. Los ensayos de inhibición competitiva han consistido en incubar las membranas celulares con el ligando [³H]LSD y el compuesto objeto de estudio, con el fin de medir la capacidad de éste para desplazar al radioligando en su unión al receptor. Este desplazamiento se expresa mediante el porcentaje de unión específica del compuesto analizado respecto de la unión del radioligando. La unión específica de los compuestos se calcula por diferencia entre la unión total y la unión inespecífica, determinada en presencia de serotonina. La incubación se ha finalizado por filtración a vacío y la radiactividad unida a las membranas se ha cuantificado mediante espectrometría de centelleo.

En el caso de compuestos cuyo desplazamiento a la concentración de 1 µM es mayor del 55%, se ha determinado su CI₅₀, mediante regresión no lineal de la curva de desplazamiento obtenida para seis concentraciones diferentes del compuesto, utilizando el programa Prism (GraphPad). El cálculo de la constante de afinidad K_i se ha realizado a partir de la CI₅₀, según la ecuación de Cheng y Prusoff: $K_i = CI_{50} / (1 + L/K_D)$, donde L es la concentración de radioligando y K_D su constante de disociación.⁷⁴

Los datos obtenidos indicaron que la mayoría de los compuestos sintetizados **I** (**1-12**) no presentaban afinidad por el 5-HT₆R ($K_i > 1000$ nM). Únicamente los compuestos con un grupo sulfonamida (X = NHSO₂) han mostrado una afinidad moderada, sin observarse una influencia clara de su posición en el anillo de bencimidazol (Tabla 2). Por tanto, las sulfonamidas **4**, **8** y **12** se seleccionaron como *hits* de cara al proceso de optimización en el desarrollo de nuevos antagonistas del receptor.

Tabla 2. Afinidades de los compuestos **I** por el h5-HT₆R, in vitro.

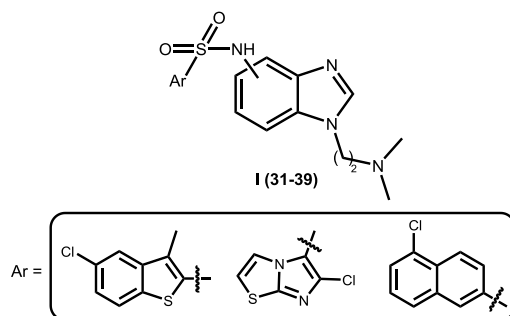


Compuesto	Posición	K_i (µM)
4	4	0,73
8	5	0,64
12	6	0,60

B.3.2. PROCESO HIT TO LEAD

Teniendo en cuenta los datos de afinidad recogidos en la Tabla 2, se consideró la síntesis de nuevos compuestos de fórmula **I** (**31-39**) en los que se

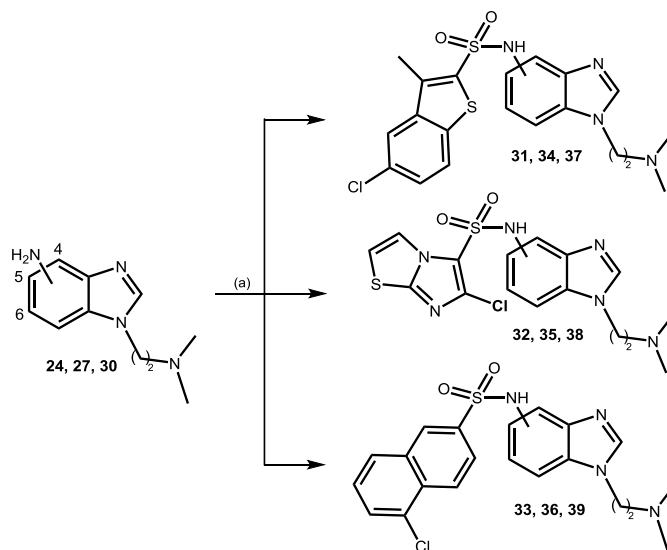
mantiene el grupo $X = \text{NHSO}_2$ y se amplía el campo estructural en el anillo aromático Ar, con los esqueletos estructurales representativos de los antagonistas 5-HT₆, representados en el Esquema 12.



Esquema 12

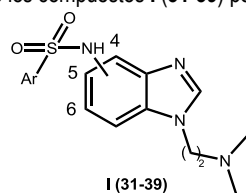
La síntesis de las sulfonamidas **31-39** se llevó a cabo por reacción de **24**, **27** ó **30** con el cloruro de sulfonilo correspondiente, en las condiciones descritas en el Esquema 13. En la Tabla 3 se recogen los datos de afinidad de los compuestos sintetizados **31-39** por el h5-HT₆R. Los valores de K_i (nM) obtenidos corresponden

a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado. En general, las nuevas sulfonamidas exhiben una afinidad 5-HT₆ de moderada a buena (Tabla 3), destacando la posición 6 del anillo de bencimidazol como la más favorable [K_i (**37**) = 74 nM; K_i (**39**) = 35 nM].



Reactivos: (a) ArSO₂Cl, piridina, diclorometano, t.a., 15 h, 20-69% (**31-37**) o NaHCO₃, acetonitrilo, t.a., 22 h, 23-38% (**38, 39**).

Esquema 13

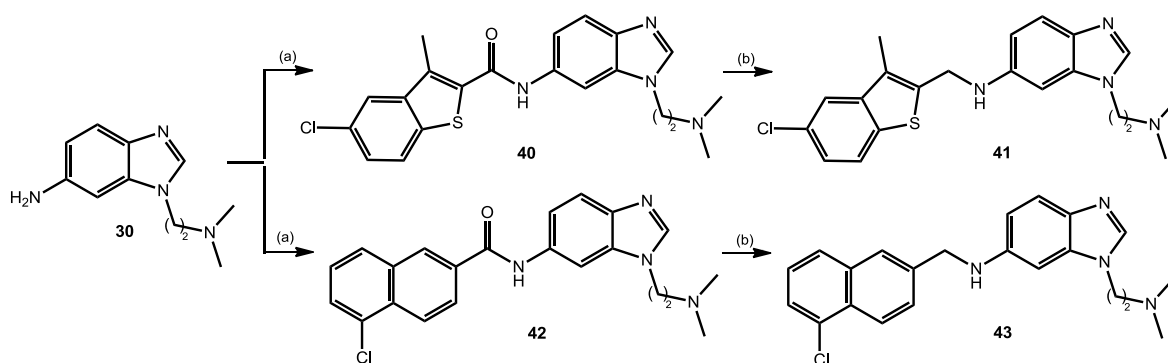
Tabla 3. Afinidades de los compuestos **I** (**31-39**) por el h5-HT₆R, in vitro.

Compuesto	Posición	Ar	$K_i \pm \text{E.E. (nM)}^a$
31	4		268 ± 25
32	4		600 ± 39
33	4		140 ± 16
34	5		735 ± 25
35	5		98 ± 7
36	5		336 ± 76
37	6		74 ± 1
38	6		545 ± 18
39 (UCM-306)	6		35 ± 1

^aLos valores obtenidos corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

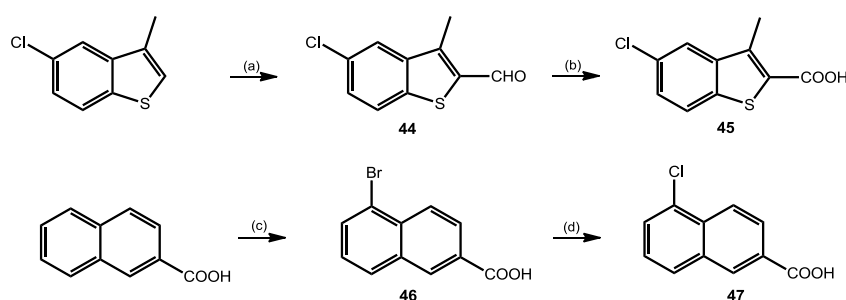
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los compuestos **37** y **39** (Tabla 3), nos planteamos explorar la posición 6 del anillo de bencimidazol con los nuevos sistemas aromáticos de benzotiofeno y naftaleno considerando el resto de grupos X (NHCO, NHCH₂). La síntesis de los nuevos compuestos finales **40-43** se llevó a cabo siguiendo la metodología habitual según se describe en el Esquema 14. Los ácidos intermedios 5-cloro-3-metilbencimidazol[*b*]tiofeno-2-carboxílico **45**⁷⁵ y 5-cloro-2-naftoico **47**⁷⁶ se prepararon según se describe

en el Esquema 15. La síntesis de **45** se llevó a cabo a partir de 5-cloro-3-metilbencimidazol[*b*]tiofeno, por reacción con *n*-BuLi en dimetilformamida y posterior oxidación del aldehído **44**⁷⁷ con clorito sódico y dihidrogenofosfato sódico en una mezcla de agua y *tert*-butanol. Para la obtención de **47** se sometió el ácido 2-naftoico a reacción con bromo y yodo en ácido acético a reflujo y el derivado bromado **46**⁷⁸ se hizo reaccionar con cloruro cuproso en dimetilsulfóxido, a 200 °C, en un reactor de microondas (Esquema 15).



Reactivos: (a) **45** ó **47**, HOBt, EDC, dimetilformamida, t.a., 3 h, 73-90%. (b) LiAlH₄, tetrahidrofurano, reflujo, 20 h, 50-56%.

Esquema 14

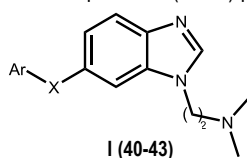


Reactivos: (a) *n*-BuLi, dimetilformamida, de -78 °C a reflujo, 2 h, 97%. (b) NaClO₂, NaH₂PO₄, H₂O/*t*BuOH, t.a., 16 h, 64%. (c) Br₂, I₂ catalítico, ácido acético, 118 °C, 1 h, 33%. (d) CuCl, dimetilsulfóxido, 200 °C, 6 min (MW), 96%.

Esquema 15

La pérdida de afinidad observada en los datos obtenidos ($K_i > 0,7 \mu\text{M}$) (Tabla 4) reveló de nuevo la importancia del grupo sulfonamida como elemento estructural clave en esta familia de ligandos. Por

tanto, se seleccionó el análogo **39** (UCM-306) de mayor afinidad ($K_i = 35 \text{ nM}$, Tabla 3) como *lead* para su caracterización funcional en el h5-HT₆R y la evaluación de sus propiedades farmacocinéticas.

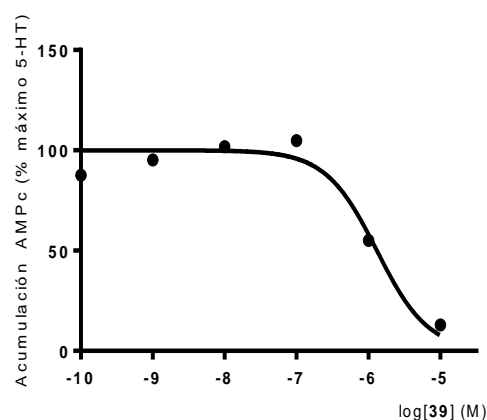
Tabla 4. Afinidades de los compuestos **I** (**40-43**) por el h5-HT₆R, in vitro.

Compuesto	X	Ar	K_i (μM)
40	NHCO		> 1
41	NHCH ₂		0,71
42	NHCO		> 1
43	NHCH ₂		0,78

La actividad funcional del ligando UCM-306 (**39**) identificado en el receptor serotoninérgico 5-HT₆ se determinó evaluando su efecto sobre la actividad de la AC en células COS7 transfectadas con el h5-HT₆R, el cual está acoplado positivamente a la cascada de dicha enzima. Así, se incubaron las células con diferentes concentraciones del compuesto objeto de estudio en ausencia (efecto agonista) o presencia (efecto antagonista) de 5-HT, y se midió la concentración de AMPc mediante espectroscopía de HTRF. La actividad de la AC se expresa como el porcentaje del efecto máximo obtenido con serotonina. Como agonista y antagonista de referencia se emplearon serotonina ($\text{CE}_{50} = 81 \text{ nM}$) y metiotepina ($\text{CI}_{50} = 13 \text{ nM}$), respectivamente.

El compuesto UCM-306 no indujo un incremento significativo de los niveles de AMPc, mientras que tras el pretratamiento con serotonina, se observó una disminución dosis-dependiente de la concentración de

AMPc con un efecto inhibitorio máximo de $87 \pm 6 \%$ (Figura 6). Estos resultados indican que el compuesto **39** se comporta como un antagonista puro del h5-HT₆R, con valores de CI_{50} de $1,40 \mu\text{M}$ y de K_b de $0,21 \mu\text{M}$.

**Figura 6.** Efecto antagonista del ligando UCM-306 (**39**) en el h5-HT₆R.

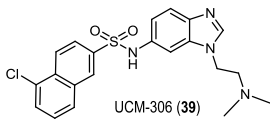
A continuación, se llevó a cabo la estimación *in silico* de las propiedades ADME mediante los valores calculados de cLogP y tPSA (Tabla 5), así como la determinación de la estabilidad metabólica del nuevo antagonista del receptor serotoninérgico h5-HT₆ identificado UCM-306 (**39**) en microsomas de rata y humanos. El compuesto se incubó a 37 °C con la fracción microsomal seleccionada en presencia del cosustrato NADPH. Seguidamente, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y, tras separar las proteínas por centrifugación, la cantidad de compuesto presente en el sobrenadante se semicuantificó mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM), integrando el pico correspondiente al compuesto de interés (M+H)⁺ y normalizando dicha área respecto al valor inicial a tiempo 0 (100%). El tiempo de vida media (t_{1/2}) del compuesto se determinó a partir del ajuste de la curva resultante a una ecuación de decaimiento exponencial. Es interesante destacar la

estabilidad del nuevo antagonista UCM-306 en el modelo de metabolismo hepático humano, con un t_{1/2} superior a 1 hora (t_{1/2} = 78 minutos, Tabla 5).

Adicionalmente, se determinó la inhibición del compuesto objeto de estudio del citocromo P450 2D6 (CYP2D6), una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos, mediante un ensayo de fluorescencia utilizando la enzima humana CYP2D6 recombinante microsomal, 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamio)etil]-7-metoxi-4-metilcumarina (AMMC) como sustrato y quinidina como inhibidor control. Tras 1 hora de incubación con el compuesto UCM-306 a la concentración de 10 µM, éste indujo una baja inhibición de CYP2D6, siendo la actividad remanente del 78% (Tabla 5).

Los resultados de los estudios de las propiedades farmacocinéticas *in vitro* indican el interesante perfil del nuevo antagonista 5-HT₆ UCM-306 (**39**), lo que justifica la exploración de su posible aplicabilidad terapéutica.

Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas *in vitro* del nuevo antagonista del receptor serotoninérgico h5-HT₆ identificado.

Ligando	Masa molar (base libre)	cLogP	tPSA (Å²)	t _{1/2} en RLM (min)	t _{1/2} en HLM (min)	Actividad remanente de CYP2D6 (%)
 UCM-306 (39)	428,94	4,54	65,01	20,7	78	78

B.3.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA IN VIVO DEL ANTAGONISTA UCM-306 (**39**)

Teniendo en cuenta los resultados *in vitro*, el compuesto UCM-306 (**39**) se ha caracterizado como un antagonista potente del 5-HT₆R, con buenas propiedades farmacocinéticas. De acuerdo con este perfil, se estudió su capacidad pro-cognitiva *in vivo* en el modelo de memoria de reconocimiento de objetos en rata, utilizando como control positivo la tacrina, un fármaco empleado para mejorar los

síntomas cognitivos asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Sesenta minutos después de la administración de vehículo (2 mL/kg, ip), UCM-306 (1 mg/kg, ip) o tacrina (0,5 mg/kg, po), se registra durante tres minutos el tiempo invertido por las ratas en explorar dos objetos idénticos. Al día siguiente se repite el experimento con una copia del objeto anterior y un objeto nuevo y se registran durante tres minutos los tiempos dedicados a explorar el objeto nuevo y el familiar.

Los datos del ensayo representados en la Figura 7A indican que en el grupo tratado con vehículo no se observó diferencia significativa en el tiempo pasado investigando el objeto nuevo y el familiar, mientras que en los grupos tratados con tacrina y UCM-306, los animales pasaron significativamente más tiempo explorando el objeto nuevo. Asimismo, en la Figura 7B se muestra el índice de reconocimiento, definido como

el cociente entre el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo y el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos.

Estos resultados revelan la capacidad pro-cognitiva del antagonista del 5-HT₆R identificado en este trabajo UCM-306 (**39**), lo que sugiere su posible aplicabilidad terapéutica en trastornos cognitivos.

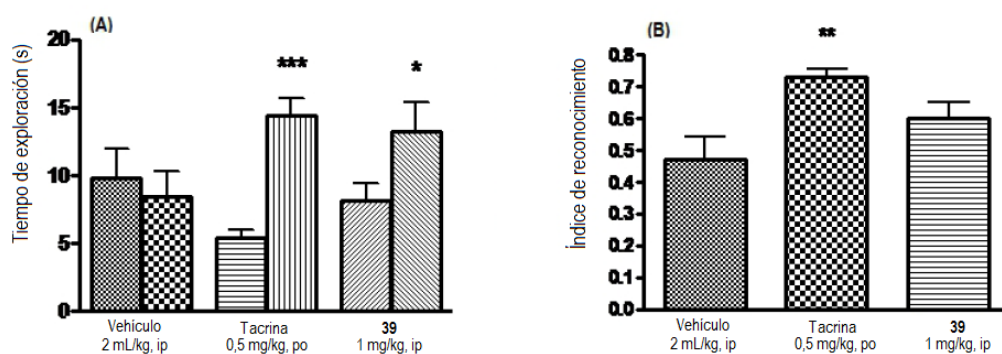


Figura 7. Efecto de UCM-306 (**39**) en el test de memoria de reconocimiento de objetos. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ indican diferencia significativa de exploración del objeto nuevo vs el objeto familiar. $N = 7-10$ animales/grupo.

B.4. PARTE EXPERIMENTAL

B.4.1. SÍNTESIS

Los puntos de fusión (p.f.) se han determinado en un aparato Stuart-Scientific. Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un espectrofotómetro "Bruker Tensor 27" equipado con un accesorio ATR Specac con cristal de diamante para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR) y las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se han registrado a temperatura ambiente y han sido obtenidos en los espectrómetros "Bruker 200-AC" a 200 y 50 MHz, respectivamente; "Bruker DPX 300" a 300 y 75 MHz; "Bruker AV 500", a 500 y 125 MHz y "Bruker AVIII 700", a 700 y 175 MHz, del Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de RMN de la UCM. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna; las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz) y se han calculado considerando sistemas de primer orden en todos los casos. En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), qt (quintuplete), m (multiplete) y a (ancho). La espectrometría de masas (EM) se ha llevado a cabo en un instrumento FTMS Bruker APEX Q IV utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI) en el CAI de EM de la UCM. El análisis de HPLC-EM se ha llevado a cabo en un espectrómetro Agilent 1200LC-EMD VL. La separación se ha realizado con una columna Eclipse XDB-C18 ($5\ \mu\text{m}$, $4,6\ \text{mm} \times 12,5\ \text{mm}$) y la fase móvil empleada consiste en un gradiente de A (agua:acetonitrilo 95:5) y B (agua:acetonitrilo 5:95) con un 0,1% de hidróxido amónico y 0,1% de ácido fórmico como aditivos. Los espectros de masas se han llevado a cabo utilizando la técnica ESI. Los picos correspondientes al ión molecular más una

unidad se indican como $(\text{M}+\text{H})^+$. Los datos de análisis elemental cuantitativo (C, H, N) se han obtenido en un instrumento LECO CHNS-932 en el CAI de Microanálisis Elemental de la UCM.

Las reacciones de hidrogenación se han realizado en un hidrogenador "Parr". La cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV (254 nm), yodo, disolución etanólica al 5% de ninhidrina o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico. Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 230-400 mesh ASTM), así como un equipo de cromatografía flash Varian 971-FP con cartuchos de gel de sílice Super Flash Si50.

Todos los productos de partida, reactivos y disolventes se han adquirido con alto grado de pureza en Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Panreac, Lancaster, Scharlab o Sigma. La trietilamina se secó sobre hidruro cálcico y se destiló antes de su utilización. El éter etílico y el diclorometano anhidros se obtuvieron por agitación sobre hidruro cálcico o sodio seguida de destilación bajo argón. El tetrahidrofurano anhidro se utilizó recién destilado bajo argón sobre sodio y benzofenona como indicador.

B.4.1.1. Reducción de 2-nitroanilinas y nitrobencimidazoles por hidrogenación catalítica. Procedimiento general

A una suspensión del correspondiente derivado de 2-nitroanilina o nitrobencimidazol en metanol anhidro ($8\ \text{mL}/\text{mmol}$) se le añade Pd(C) al 10% ($0,02\ \text{g}/\text{mmol}$) y la mezcla se hidrogena a temperatura ambiente durante 15 horas, a una presión inicial de hidrógeno de 50 psi ($\text{libras}/\text{pulgada}^2$). Una vez terminada la reacción, se filtra sobre celita y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose las fenilendiaminas o los aminobencimidazoles correspondientes, que se emplean en la siguiente etapa sin purificación posterior.

B.4.1.2. Ciclación de fenilendiaminas en medio ácido. Procedimiento general

Una disolución de la correspondiente fenilendiamina y ácido fórmico (2,9 equiv) en agua (0,8 mL/mmol) se calienta a reflujo durante 3-6 horas. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el crudo de reacción se vierte sobre agua helada (1,6 mL/mmol), se basifica con una disolución acuosa de KOH 1 M hasta pH 9-10 y el producto deseado precipita como un sólido que se filtra, se seca a vacío y se purifica por recristalización. En caso de no precipitar, el producto se extrae con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el derivado de bencimidazol sin purificación posterior.

B.4.1.3. Formación de amidas vía cloruro de ácido. Procedimiento general

A una suspensión del correspondiente ácido bencimidazolcarboxílico en tolueno anhidro (3,2 mL/mmol), se le adiciona gota a gota, cloruro de tionilo (11,1 equiv) y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el exceso de cloruro de tionilo se destila y el disolvente se elimina a presión reducida y el cloruro de ácido intermedio se resuspende en tetrahidrofurano anhidro (3,2 mL/mmol). A continuación se añade, a 0° C y en pequeñas porciones, anilina (1 equiv) y la mezcla se agita a reflujo durante 15 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se resuspende en NaHCO₃ (2 x 5 mL) y se extrae con diclorometano o acetato de etilo. Las fracciones orgánicas se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la amida correspondiente.

B.4.1.4. Formación de amidas a partir de ácido carboxílico. Procedimiento general

A una disolución del ácido carboxílico correspondiente en dimetilformamida anhidra (4 mL/mmol), se le añaden HOBt (1,2 equiv; en el caso de las sales de los compuestos **19** y **21**, 3,6 equiv) y el clorhidrato de EDC (1,2 equiv) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se añade gota a gota una disolución de la amina correspondiente (1,3 equiv) en dimetilformamida anhidra (2 mL/mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se resuspende en acetato de etilo y se lava con agua y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la correspondiente amida.

B.4.1.5. N-Alquilación de derivados de bencimidazol. Procedimiento general

A una suspensión del correspondiente derivado de bencimidazol y el clorhidrato de 2-cloro-N,N-dimetiletilamina (1,5 equiv) en dimetilformamida anhidra (5,0 mL/mmol), bajo atmósfera de argón, se le añaden K₂CO₃ (5 equiv) y NaI (1,5 equiv). La mezcla se mantiene a 60° C durante 15 horas y, una vez enfriada a temperatura ambiente, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se resuspende en agua y se extrae con acetato de etilo. Las fracciones orgánicas se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose el derivado N-alkilado correspondiente.

B.4.1.6. Sustitución nucleófila de o-nitro y p-nitrofluorobencenos. Procedimiento general

A una suspensión de K_2CO_3 (1,8 equiv) en dimetilformamida anhidra (0,68 mL/mmol), bajo atmósfera de argón, se le añaden el correspondiente fluorobenceno y *N,N*-dimetiletilendiamina (0,9 equiv). La mezcla se mantiene a 90 °C durante 12 horas y, tras alcanzar la temperatura ambiente, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la anilina correspondiente.

B.4.1.7. Ciclación reductora de 2-nitroanilinas. Procedimiento general

A una disolución de la correspondiente 2-nitroanilina en metanol (1,4 mL/mmol) se le añade Pd(C) al 10% (0,04 g/mmol). Tras agitar la mezcla durante 30 minutos se añade ácido fórmico (6,7 mL/mmol) y se calienta a reflujo durante 15-20 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se resuspende en acetato de etilo y se basifica con una disolución acuosa de NaOH 1 M hasta pH 9-10. Se lava la fase orgánica con una disolución saturada de NaCl, se seca sobre $MgSO_4$ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el correspondiente bencimidazol *N*-alquilado, que se purifica por cromatografía.

B.4.1.8. Formación de sulfonamidas. Procedimientos generales

• *Método A.* A una disolución del derivado de aminobencimidazol correspondiente en tetrahidrofurano anhidro (22,2 mL/mmol) y trietilamina (1 equiv) bajo atmósfera de argón, se añade gota a gota el cloruro de sulfonilo adecuado (1 equiv). La mezcla se mantiene a reflujo durante 20-24 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se resuspende en diclorometano y se lava con disoluciones saturadas de $NaHCO_3$ y NaCl.

Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la sulfonamida correspondiente.

• *Método B.* A una disolución del derivado de aminobencimidazol correspondiente en diclorometano anhidro (6 mL/mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se le añade piridina anhidra (2 equiv), seguido del cloruro de sulfonilo adecuado (1,05 equiv) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. A continuación, la mezcla se lava con agua y disolución saturada de NaCl, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la sulfonamida correspondiente.

• *Método C.* A una disolución del derivado de aminobencimidazol correspondiente en acetonitrilo anhidro (5 mL/mmol) bajo atmósfera de argón, se le añade $NaHCO_3$ (2,8 equiv) y se agita 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añade el cloruro de sulfonilo correspondiente (1,05 equiv) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 22 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtra para eliminar las sales y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la sulfonamida correspondiente.

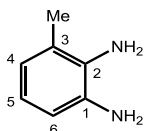
B.4.1.9. Reducción de amidas. Procedimiento general

A una suspensión de $LiAlH_4$ (4,6 equiv) en tetrahidrofurano anhidro (1,1 mL/mmol) bajo atmósfera de argón se le añade una disolución de la amida correspondiente en tetrahidrofurano anhidro (1,1 mL/mmol) y la mezcla se mantiene a reflujo durante 20-24 horas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se introduce el matraz de reacción en un baño de hielo y se le añade éter anhidro (1,3 mL/mmol) y una disolución de NaOH 1 M (1,3 mL/mmol), manteniendo

la agitación constante. Se decanta la fase etérea y tras lavar la fase acuosa con éter anhidro (3 x 5 mL), los extractos orgánicos se lavan con agua, se secan sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose la amina correspondiente, que se transforma en su clorhidrato.

B.4.1.10. 2-Amino-3-metilnilina, **13**⁷¹

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.1 a partir de 866 mg (5,7 mmol) de 2-metil-6-nitroanilina y 114 mg de Pd(C) al 10%, se obtuvieron 591 mg (Rto. 85%) de **13**.



p.f. 58-59 °C (hexano) (lit.⁷¹ p.f. 61-63 °C).

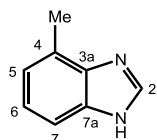
IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 3370, 3280, 3210 (NH_2), 1630, 1600, 1580, 1480 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,16 (s, 3H, CH_3), 3,33 (s, 4H, 2 NH_2 , intercambiable con D_2O), 6,55-6,64 (m, 3H, H_4 , H_5 , H_6).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 17,2 (CH_3), 114,8 (C_6), 118,8 (C_5), 121,8 (C_4), 123,0 (C_3), 133,2; 133,6 (C_1 , C_2).

B.4.1.11. 4-Metilbencimidazol, **14**⁷¹

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.2 a partir de 561 mg (4,6 mmol) de **13** y 610 mg (13,3 mmol, 0,5 mL) de ácido fórmico, se obtuvieron 425 mg (Rto. 70%) de **14**.



p.f. 142-143 °C (agua) (lit.⁷¹ p.f. 143-145 °C).

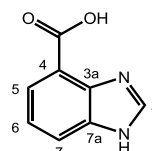
IR (KBr, cm^{-1}): 3070 (NH), 1610, 1595, 1485 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,63 (s, 3H, CH_3), 7,10 (d, $J = 7,2$, 1H, H_5), 7,21 (t, $J = 8,2$, 1H, H_6), 7,51 (d, $J = 8,1$, 1H, H_7), 8,17 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 17,2 (CH_3), 112,5 (C_7), 122,7; 123,0 (C_5 , C_6), 125,7 (C_4), 137,1; 137,6 (C_{3a} , C_{7a}), 140,4 (C_2).

B.4.1.12. Síntesis del ácido 4-bencimidazolcarboxílico, **15**⁷¹

A una disolución de 1,32 g (10 mmol) de **14** en 100 mL de agua, calentada a 100 °C, se le añaden 5 porciones de 1,7 g (11 mmol) de KMnO_4 , a intervalos de 1 hora. Tras la última adición, la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 1-2 horas más. A continuación, se filtra el MnO_2 en caliente, el agua se elimina a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna (cloroformo:metanol 9:1→1:1) y recristalización posterior de HCl diluido, 693 mg (Rto. 35%) de **15**, en forma de clorhidrato (p.f. > 300 °C, lit.⁷⁹ p.f. > 300 °C).



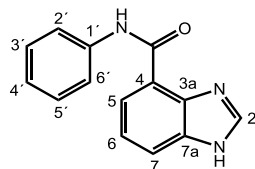
IR (KBr, cm^{-1}): 3330 (OH), 3000 (NH), 1690 (COOH), 1620, 1530, 1485, 1470 (Ar).

^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 7,71 (td, $J = 8,1$; 2,7, 1H, H_6), 8,11 (d, $J = 6,6$, 1H, H_5), 8,17 (d, $J = 8,1$, 1H, H_7), 9,71 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 117,9 (C_4), 119,9 (C_7), 126,0 (C_6), 128,0 (C_5), 129,6 (C_{3a}), 132,4 (C_{7a}), 142,3 (C_2), 165,6 (COOH).

B.4.1.13. N-Fenil-1H-benzimidazol-4-carboxamida, **16**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.3 a partir de 614 mg (3,1 mmol) de **15**, 4,1 g (34,4 mmol, 2,5 mL) de cloruro de tionilo y 289 mg (3,1 mmol, 0,28 mL) de anilina, se obtuvieron 522 mg (Rto. 71%) de **16**.



p.f. 99-101 °C.

Cromatografía: diclorometano/diclorometano:etanol 9:1.

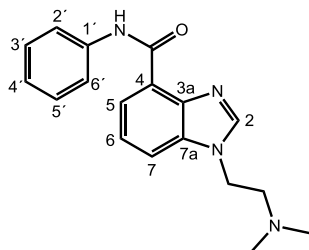
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3140, 3046 (NH), 1657 (NHCO), 1607, 1556, 1490 (Ar).

^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 7,15 (t, $J = 7,5$, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7,40-7,44 (m, 3H, H_6 , $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7,81 (d, $J = 7,7$, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 7,85 (d, $J = 8,0$, 1H, H_7), 8,00 (d, $J = 7,5$, 1H, H_5), 8,61 (s, 1H, H_2), 12,20 (sa, 1H, NH), 13,15 (sa, 1H, NH).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 117,0 (C_7), 120,4 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 123,0 (C_4), 123,4; 123,6 (C_5 , C_6), 124,6 ($\text{C}_{4'}$), 129,9 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 134,4 (C_{7a}), 139,8; 141,4 (C_{3a} , $\text{C}_{1'}$), 144,0 (C_2), 163,9 (CO).

B.4.1.14. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-N-fenil-1H-benzimidazol-4-carboxamida, 1

Seguendo el procedimiento general B.4.1.5 a partir de 140 mg (0,59 mmol) de **16**, 128 mg (0,89 mmol) del clorhidrato de 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina, 407 mg (2,95 mmol) de K_2CO_3 y 132 mg (0,89 mmol) de NaI, se obtuvieron 90 mg (Rto. 50%) de **1**.



p.f. 127-129 °C.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo 8:2 \rightarrow 2:8.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3255, 3088 (NH), 1675 (NHCO), 1610, 1559, 1499, 1448 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,37 (s, 6H, 2CH_3), 2,84 (t, $J = 6,4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4,40 (t, $J = 6,4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 7,12 (tt, $J = 7,3$; 1,1, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7,35-

7,50 (m, 3H, H_6 , $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7,61 (dd, $J = 8,2$; 1,1, 1H, H_7), 7,89 (dd, $J = 8,7$; 1,4, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 8,18 (s, 1H, H_2), 8,27 (dd, $J = 7,5$; 1,1, 1H, H_5), 12,00 (sa, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 45,8 (2CH_3), 58,7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 113,6 (C_7), 120,7 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 123,5; 124,2; 124,7 (C_5 , C_6 , $\text{C}_{4'}$), 124,4 (C_4), 129,3 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 134,3 (C_{7a}), 139,6; 141,4 (C_{3a} , $\text{C}_{1'}$), 143,5 (C_2), 163,8 (CO).

EM (ESI): 309,2 ($\text{M}+\text{H}^+$), 310,2 ($\text{M}+2\text{H}^+$).

Análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$:

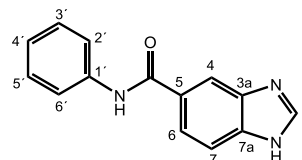
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 70,22; H: 6,58; N: 18,02.

B.4.1.15. N-Fenil-1H-benzimidazol-5-carboxamida, 17⁸⁰

Seguendo el procedimiento general B.4.1.3 a partir de 1 g (6,17 mmol) de ácido 5-benzimidazolcarboxílico, 8,1 g (68,5 mmol, 5 mL) de cloruro de tionilo y 575 mg (6,17 mmol, 0,56 mL) de anilina, se obtuvieron 1,1 g (Rto. 75 %) de **17**.



p.f. 120-123 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 \rightarrow 8:2.

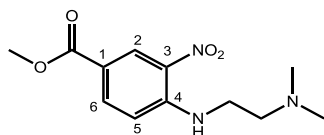
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3441, 2923 (NH), 1637 (NHCO), 1599, 1534, 1501, 1463 (Ar).

^1H -RMN (MeOD , δ): 7,12 (t, $J = 7,4$, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7,37 (t, $J = 7,9$, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7,79 (d, $J = 7,6$, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 7,94 (d, $J = 8,6$, 1H, H_7), 8,14 (dd, $J = 8,7$; 1,5, 1H, H_6), 8,45 (d, $J = 0,9$, 1H, H_4), 9,59 (s, 1H, H_2), 10,57 (sa, 1H, NH).

^{13}C -RMN (MeOD , δ): 115,6 (C_7), 122,4 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 124,2; 126,0; 127,3 (C_4 , C_6 , $\text{C}_{4'}$), 129,9 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 131,9; 134,3 (C_5 , $\text{C}_{1'}$), 135,3; 139,7 (C_{3a} , C_{7a}), 143,1 (C_2), 167,4 (CO).

B.4.1.16. 4-[[2-(Dimetilamino)etil]amino]-3-nitrobenzoato de metilo, **18**⁸¹

Seguendo el procedimiento general B.4.1.6 a partir de 500 mg (2,51 mmol) de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo, 198 mg (2,25 mmol, 0,24 mL) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 621 mg (4,50 mmol) de K₂CO₃, se obtuvieron 436 mg (Rto. 65%) de **18**.



p.f. 75-77 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3349 (NH), 1723 (CO), 1539 (NO₂), 1614, 1539, 1498, 1433 (Ar).

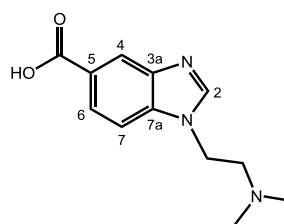
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,43 (s, 6H, 2CH₃), 2,77 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂N), 3,53 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂NH), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 6,92 (d, *J* = 8,9, 1H, H₅), 8,09 (dd, *J* = 9,0; 1,9, 1H, H₆), 8,65 (sa, 1H, NH), 8,88 (d, *J* = 1,9, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 44,4 (CH₂NH), 45,3 (2CH₃), 57,0 (CH₂N), 62,8 (OCH₃), 108,6 (C₅), 120,7 (C₁), 123,7 (C₂), 126,8 (C₃), 132,4 (C₆), 141,7 (C₄), 167,9 (CO).

B.4.1.17. Síntesis del ácido 1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, **19**

Seguendo el procedimiento general B.4.1.7 a partir de 165 mg (0,62 mmol) de **18**, 24 mg de Pd(C) al 10% y 4,9 g de ácido fórmico (0,11 mol, 4 mL), se obtienen 148 mg (0,62 mmol) de 1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo. Éste se purifica por cromatografía en columna (diclorometano:etanol 9,5:0,5) y se suspende en una disolución de 72 mg (1,8 mmol) de NaOH en 5,2 mL de MeOH. Se le añaden 0,24 mL de agua y la reacción se calienta a reflujo durante 2 horas. A continuación, se añaden 5 mL de agua, se acidifica la mezcla con HCl hasta pH 1-2 y se extrae con acetato de etilo. Se separa la fase acuosa y se elimina el

disolvente a presión reducida, obteniéndose 151 mg (Rto. 80%) del diclorhidrato del ácido bencimidazolcarboxílico **19**.



p.f. 222-225 °C.

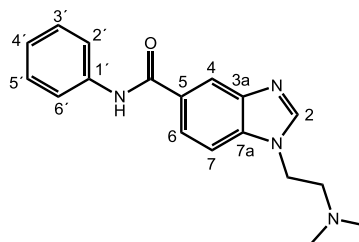
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3380 (OH), 1709 (COOH), 1623, 1443 (Ar).

¹H-RMN (D₂O, δ): 2,88 (s, 6H, 2CH₃), 3,70 (t, *J* = 7,0, 2H, CH₂N), 4,90 (t, *J* = 7,1, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,79 (d, *J* = 8,8, 1H, H₇), 8,06 (d, *J* = 8,8, 1H, H₆), 8,26 (s, 1H, H₄), 9,40 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (D₂O, δ): 41,6 (CH₂Nbencimidazol), 43,3 (2CH₃), 54,5 (CH₂N(CH₃)₂), 112,5 (C₇), 117,5 (C₄), 127,8 (C₆), 128,9 (C₅), 130,9 (C_{7a}), 132,9 (C_{3a}), 143,3 (C₂), 168,8 (COOH).

B.4.1.18. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-*N*-fenil-1*H*-bencimidazol- 5-carboxamida, **5**

Seguendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 122 mg (0,40 mmol) del diclorhidrato de **19**, 195 mg (1,44 mmol) de HOBt, 92 mg (0,48 mmol) del clorhidrato de EDC y 48 mg (0,52 mmol, 47 µL) de anilina, se obtuvieron 77 mg (Rto. 62%) de **5**.



p.f. 161-163 °C.

Cromatografía: diclorometano: etanol 9:1 → 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2946, 2825 (NH), 1655 (NHCO), 1598, 1538, 1500, 1440 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2,32 (s, 6H, 2CH_3), 2,76 (t, $J = 6,4$, 2H, CH_2N), 4,29 (t, $J = 6,4$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,17 (t, $J = 7,4$, 1H, H_4), 7,40 (t, $J = 7,8$, 2H, H_3 , H_5), 7,50 (d, $J = 8,5$, 1H, H_7), 7,73 (d, $J = 7,8$, 2H, H_2 , H_6), 7,96 (d, $J = 8,5$, 1H, H_6), 8,09 (s, 1H, H_4), 8,36 (s, 1H, H_2), 8,40 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 43,5 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,9 (2CH_3), 58,6 (CH_2N), 110,0 (C_7), 119,1 (C_4), 120,2 (C_2 , C_6), 123,0 (C_6), 124,4 (C_4), 129,0 (C_3 , C_5), 129,4 (C_5), 136,4 (C_1), 138,4 (C_{7a}), 143,2 (C_{3a}), 145,2 (C_2), 166,1 (CO).

EM (ESI): 309,1 ($\text{M}+\text{H}^+$), 310,2 ($\text{M}+2\text{H}^+$).

Análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$:

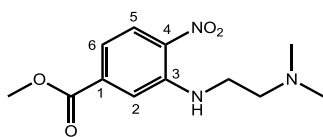
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 70,01; H: 6,64; N: 18,30.

B.4.1.19. 3-[[2-(Dimetilamino)etil]amino]-4-nitrobenzoato de metilo, 20

Seguendo el procedimiento general B.4.1.6 a partir de 500 mg (2,51 mmol) de 3-fluoro-4-nitrobenzoato de metilo, 198 mg (2,25 mmol, 0,24 mL) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 621 mg (4,50 mmol) de K_2CO_3 , se obtuvieron 476 mg (Rto. 71%) de **20**.



p.f. 75-78 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

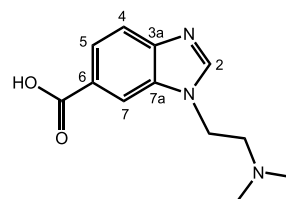
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3364 (NH), 1722 (CO), 1573 (NO_2), 1625, 1497, 1466, 1407 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2,35 (s, 6H, 2CH_3), 2,68 (t, $J = 6,1$, 2H, CH_2N), 3,43 (q, $J = 5,9$, 2H, CH_2NH), 3,96 (s, 3H, COOCH_3), 7,23 (dd, $J = 8,9$; 1,7, 1H, H_6), 7,56 (d, $J = 1,7$, 1H, H_2), 8,23 (d, $J = 8,9$, 1H, H_5), 8,33 (sa, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 40,8 (CH_2NH), 45,3 (2CH_3), 52,7 (CH_3), 57,3 (CH_2N), 115,0 (C_2), 116,0 (C_6), 127,2 (C_5), 133,9; 136,4; 144,8 (C_1 , C_3 , C_4), 165,9 (CO).

B.4.1.20. Síntesis del ácido 1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-bencimidazol-6-carboxílico, 21

Seguendo el procedimiento general B.4.1.7 a partir de 370 mg (1,39 mmol) de **20**, 56 mg de Pd(C) al 10% y 11,3 g de ácido fórmico (0,25 mol, 9,4 mL), se obtienen 346 mg (1,4 mmol) de 1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo. Éste se purifica por cromatografía en columna (diclorometano:etanol 9,5:0,5) y se suspende en una disolución de 168 mg (4,2 mmol) de NaOH en 12 mL de MeOH. Se le añaden 0,56 mL de agua y la reacción se calienta a reflujo durante 2 horas. A continuación, se añaden 11,8 mL de agua, se acidifica la mezcla con HCl hasta pH 1-2 y se extrae con acetato de etilo. Se separa la fase acuosa y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 362 mg (Rto. 85%) del diclorhidrato del ácido bencimidazolcarboxílico **21**.



p.f. 227-230 °C.

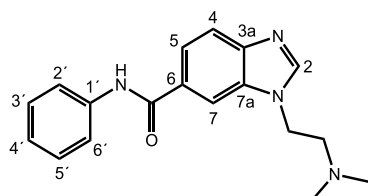
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3390 (OH), 1711 (COOH), 1554, 1446 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , δ): 2,99 (s, 6H, 2CH_3), 3,83 (t, $J = 7,1$, 2H, CH_2N), 5,04 (t, $J = 7,1$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,93 (d, $J = 8,7$, 1H, H_4), 8,25 (d, $J = 8,7$, 1H, H_5), 8,56 (s, 1H, H_7), 9,51 (s, 1H, H_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O , δ): 41,1 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 43,8 (2CH_3), 55,0 (CH_2N), 115,2 (C_7), 116,0 (C_4), 128,8 (C_5), 129,4 (C_6), 131,0 (C_{7a}), 134,5 (C_{3a}), 143,8 (C_2), 169,4 (COOH).

B.4.1.21. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-N-fenil-1H-bencimidazol-6-carboxamida, 9

Seguendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 213 mg (0,70 mmol) del diclorhidrato de **21**, 341 mg (2,5 mmol) de HOBt, 161 mg (0,84 mmol) del clorhidrato de EDC y 85 mg (0,91 mmol, 83 μL) de anilina, se obtuvieron 136 mg (Rto. 63%) de **9**.



p.f. 165-168 °C.

Cromatografía: diclorometano: etanol 9:1 → 8:2.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 2924, 2855 (NH), 1654 (NHCO), 1599, 1538, 1496, 1441 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,33 (s, 6H, 2CH_3), 2,80 (t, $J = 6,5$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4,34 (t, $J = 6,5$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,16 (t, $J = 7,4$, 1H, H_4), 7,39 (t, $J = 7,9$, 2H, H_3 , H_5), 7,70 (d, $J = 7,8$, 2H, H_2 , H_6), 7,74 (dd, $J = 8,4$; 1,4, 1H, H_5), 7,85 (d, $J = 8,4$, 1H, H_4), 8,11 (sa, 1H, NH), 8,13 (s, 1H, H_2 ó H_7), 8,18 (s, 1H, H_7 ó H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,2 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,4 (2CH_3), 58,3 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 110,3 (C_7), 120,1; 120,2; 120,3 (C_4 , C_5 , C_2 , C_6), 124,5 (C_4), 129,1 (C_3 , C_5), 129,6 (C_6), 134,0 (C_{7a}), 138,2 (C_1), 145,8 (C_2), 146,2 (C_{3a}), 165,9 (CO).

EM (ESI): 308,9 (M^+), 309,9 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$:

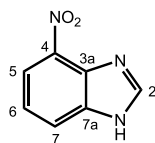
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 70,23; H: 6,45; N: 18,20.

B.4.1.22. 4-Nitro-1H-benzimidazol, **22**⁷³

Seguendo el procedimiento general B.4.1.2 a partir de 1,4 g (9,2 mmol) 1,2-diamino-3-nitrobenzoceno y 1,23 g (26,7 mmol, 1 mL) de ácido fórmico, se obtuvieron 1,5 g (Rto. cuantitativo) de **22**.



p.f. 239-241 °C (lit.⁷³ = 247-249 °C).

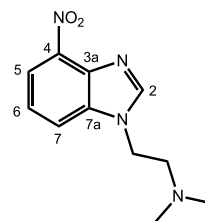
IR (KBr , cm^{-1}): 2924, 2855 (NH), 1531 (NO_2), 1638, 1589, 1492 (Ar).

^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 7,40 (t, $J = 8,1$, 1H, H_6), 8,17 (d, $J = 8,3$, 2H, H_5 , H_7), 8,81 (s, 1H, H_2), 13,30 (sa, 1H, NH).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 119,9 (C_5 ó C_7), 122,1 (C_6), 128,2 (C_5 ó C_7), 146,1 (C_2), 128,1; 134,1; 147,1 (C_{3a} , C_4 , C_{7a}).

B.4.1.23. N,N-Dimetil-2-(4-nitro-1H-benzimidazol-1-yl)etanamina, **23**

Seguendo el procedimiento general B.4.1.5 a partir de 500 mg (3,07 mmol) de **22** y 669 mg (4,65 mmol) del clorhidrato de 2-cloro-N,N-dimetiletanamina, se obtuvieron los dos regioisómeros correspondientes (4-nitro y 7-nitro, en proporción 6:4, respectivamente), cuya separación cromatográfica dio lugar a 239 mg (Rto. 33%) de **23** (aceite).



Cromatografía: acetato de etilo/acetato de etilo:metanol 9,5:0,5.

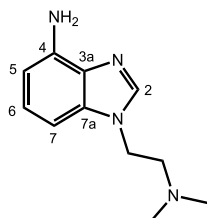
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 2945, 2862 (NH), 1520 (NO_2), 1576, 1462 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,28 (s, 6H, 2CH_3), 2,72 (t, $J = 6,2$, 2H, CH_2N), 4,30 (t, $J = 6,2$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,38 (t, $J = 8,1$, 1H, H_6), 7,73 (dd, $J = 8,1$; 0,7, 1H, H_7), 8,11 (d, $J = 8,1$, 1H, H_5), 8,24 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,7 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,5 (2CH_3), 58,4 (CH_2N), 116,2; 119,3; 122,0 (C_5 , C_6 , C_7), 136,7; 137,2; 139,4 (C_4 , C_{3a} , C_{7a}), 146,8 (C_2).

B.4.1.24. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-1H-4-aminobenzimidazol, **24**

Seguendo el procedimiento general B.4.1.1 a partir de 1,0 g (4,27 mmol) de **23** y 86 mg de Pd(C) al 10%, se obtuvieron 871 mg (Rto. cuantitativo) de **24** (aceite).



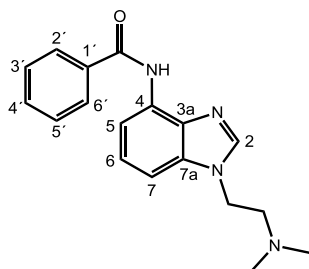
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3350, 3213 (NH₂), 1671, 1618, 1496, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,29 (s, 6H, 2CH₃), 2,70 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂N), 4,18 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,20 (sa, 2H, NH₂), 6,53 (d, *J* = 7,6, 1H, H₅), 6,78 (d, *J* = 8,0, 1H, H₇), 7,10 (t, *J* = 7,9, 1H, H₆), 7,84 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,3 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 58,5 (CH₂N(CH₃)₂), 99,2 (C₇), 105,8 (C₅), 124,0 (C₆), 132,8; 134,6; 139,1 (C_{3a}, C₄, C_{7a}), 141,1 (C₂).

B.4.1.25. *N*-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-4-il}benzamida, 2

Seguendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 194 mg (0,95 mmol) de **24**, 119 mg (0,88 mmol) de HOBt, 169 mg (0,88 mmol) del clorhidrato de EDC y 89 mg (0,73 mmol) de ácido benzoico, se obtuvieron 200 mg (Rto. 89%) de **2**.



p.f. 109-112 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3406, 3061 (NH), 1671 (NHCO), 1623, 1594, 1532, 1491, 1458, 1426 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,32 (s, 6H, 2CH₃), 2,76 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂N), 4,28 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,18 (d, *J* = 8,1, 1H, H₇), 7,36 (t, *J* = 8,0, 1H, H₆), 7,38-7,57 (m,

3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 7,96 (s, 1H, H₂), 8,00 (d, *J* = 7,9, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 8,43 (d, *J* = 7,8, 1H, H₅), 9,18 (sa, 1H, NHCO).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,5 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 58,5 (CH₂N(CH₃)₂), 105,0 (C₇), 111,2 (C₅), 124,0 (C₆), 127,3 (C₂, C_{6'}), 128,8 (C_{3'}, C_{5'}), 130,2 (C₁), 131,9 (C_{4'}), 133,8; 134,3; 134,9 (C_{3a}, C₄, C_{7a}), 142,0 (C₂), 165,6 (CO).

EM (ESI): 308,8 (M)⁺, 309,8 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₈H₂₀N₄O:

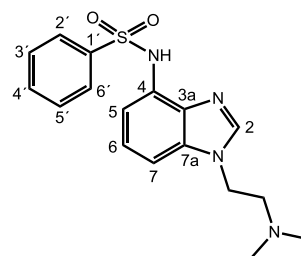
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 70,48; H: 6,79; N: 17,70.

B.4.1.26. *N*-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-4-il}bencenosulfonamida, 4

Seguendo el método A del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 40 mg (0,20 mmol) de **24**, 35 mg de cloruro de bencenosulfonilo (0,20 mmol, 25 μL), 20 mg (0,20 mmol, 28 μL) de trietilamina, se obtuvieron 62 mg (Rto. 90%) de **4**.



p.f. 121-123 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3047 (NH), 1597, 1497, 1461, 1413 (Ar), 1334, 1162 (NH₂SO₂).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,29 (s, 6H, 2CH₃), 2,71 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂N), 4,20 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,10 (d, *J* = 8,1, 1H, H₇), 7,22 (t, *J* = 8,0, 1H, H₆), 7,37 (t, *J* = 8,1, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7,46-7,47 (m, 2H, H_{4'}, H₅), 7,89 (d, *J* = 7,4, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7,93 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,4 (CH₂Nbencimidazol), 45,5 (2CH₃), 58,4 (CH₂N), 105,4 (C₇), 110,8 (C₅), 123,6 (C₆),

127,2 (C_{2'}, C_{6'}), 128,9 (C_{3'}, C_{5'}), 132,7 (C_{4'}), 128,7; 134,2; 134,7; 139,6 (C_{3a}, C₄, C_{7a}, C_{1'}), 142,7 (C₂).

EM (ESI): 345,1 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₇H₂₀N₄O₂S:

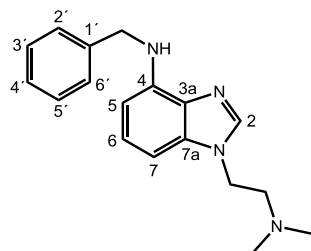
C: 59,28; H: 5,85; N: 16,27; S: 9,31.

Análisis encontrado:

C: 59,16; H: 6,22; N: 15,80; S: 9,19.

B.4.1.27. *N*-bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-4-aminobenzimidazol, **3**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.9 a partir de 31 mg (0,10 mmol) de **2** y 18 mg (0,46 mmol) de LiAlH₄, se obtuvieron 28,7 mg (Rto. 97%) de **3** (aceite).



Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 8:2.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2925, 2857 (NH), 1603, 1500, 1461 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,33 (s, 6H, 2CH₃), 2,75 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂N), 4,24 (t, *J* = 6,8, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,55 (s, 2H, CH₂NH), 5,33 (sa, 1H, NH), 6,39 (d, *J* = 7,8, 1H, H₅ ó H₇), 6,75 (d, *J* = 8,0, 1H, H₅ ó H₇), 7,14 (t, *J* = 8,0, 1H, H₆), 7,33-7,37 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 7,45 (d, *J* = 7,5, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7,84 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,7 (CH₂Nbencimidazol), 46,0 (2CH₃), 48,2 (CH₂NH), 58,9 (CH₂N), 98,6 (C₇), 101,6 (C₅), 124,8 (C₆), 127,5 (C_{4'}), 127,9 (C_{2'}, C_{6'}), 128,9 (C_{3'}, C_{5'}), 132,5; 134,5; 139,8; 140,9 (C_{3a}, C₄, C_{7a}, C_{1'}), 141,1 (C₂).

EM (ESI): 295,2 (M+H)⁺, 296,2 (M+2H)⁺

Análisis calculado para C₁₈H₂₂N₄·3HCl·H₂O:

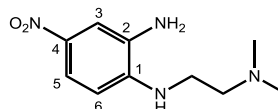
C: 51,26; H: 6,45; N: 13,28.

Análisis encontrado:

C: 51,07; H: 6,74; N: 12,78.

B.4.1.28. *N*'-[2-(Dimetilamino)etil]-4-nitrobenceno-1,2-diamina, **25**⁸²

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.6 a partir de 1,0 g (6,41 mmol) de 2-fluoro-5-nitroanilina, 507 mg (5,76 mmol, 0,62 mL) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 1,59 g (11,5 mmol) de K₂CO₃, se obtuvo 1,12 g (Rto. 78%) de **25** (aceite).



Cromatografía: diclorometano:etanol 9:1.

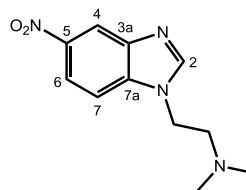
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3350, 2926 (NH₂, NH), 1568 (NO₂), 1618, 1507, 1466 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,33 (s, 6H, 2CH₃), 2,68 (t, *J* = 6,0, 2H, CH₂N), 3,26 (t, *J* = 6,3, 2H, CH₂NH), 3,30 (sa, 1H, NH), 5,00 (sa, 2H, NH₂), 6,54 (d, *J* = 8,7, 1H, H₆), 7,63 (d, *J* = 2,7, 1H, H₃), 7,84 (dd, *J* = 8,7; 2,4, 1H, H₅).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 40,6 (CH₂NH), 45,1 (2CH₃), 57,4 (CH₂N), 108,3; 111,6; 119,0 (C₃, C₅, C₆), 132,4; 138,2; 144,5 (C₁, C₂, C₄).

B.4.1.29. *N,N*-Dimetil-2-(5-nitro-1*H*-bencimidazol-1-il)etanamina, **26**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.2 a partir de 500 mg (2,23 mmol) de **25** y 298 mg (6,47 mmol, 0,24 mL) de ácido fórmico, se obtuvieron 480 mg (Rto. 92%) de **26** (aceite).



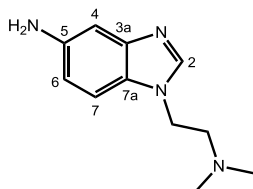
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1508 (NO₂), 1617, 1587, 1508, 1461 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,31 (s, 6H, 2CH₃), 2,75 (t, *J* = 6,2, 2H, CH₂N), 4,29 (t, *J* = 6,3, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,47 (d, *J* = 8,9, 1H, H₇), 8,21 (s, 1H, H₂), 8,27 (dd, *J* = 8,9; 2,1, 1H, H₆), 8,74 (d, *J* = 2,1, 1H, H₄).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,7 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,6 (2CH_3), 58,4 (CH_2N), 110,0 (C_7), 117,7 (C_4), 119,3 (C_6), 138,3 (C_{7a}), 143,5; 144,3 (C_{3a} , C_5), 147,0 (C_2).

B.4.1.30. 1-[2-(Dimetilamino)etil]-1H-5-aminobencimidazol, 27

Seguendo el procedimiento general B.4.1.1 y a partir de 187 mg (0,80 mmol) de **26** y 16 mg de Pd(C) al 10%, se obtuvieron 163 mg (Rto. cuantitativo) de **27** (aceite).



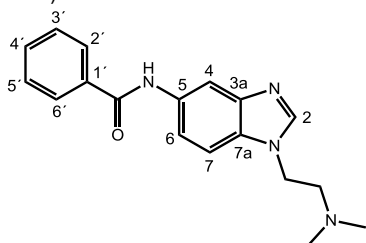
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3336, 3213 (NH_2), 1629, 1498, 1457 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,31 (s, 6H, 2CH_3), 2,71 (t, $J = 6,8$, 2H, CH_2N), 4,18 (t, $J = 6,8$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 6,74 (dd, $J = 8,5$; 2,0, 1H, H_6), 7,10 (d, $J = 2,0$, 1H, H_4), 7,18 (d, $J = 8,5$, 1H, H_7), 7,86 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,4 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,6 (2CH_3), 58,6 (CH_2N), 105,3 (C_4), 109,8 (C_7), 113,1 (C_6), 127,9 (C_{7a}), 143,2 (C_2), 142,0; 144,9 (C_{3a} , C_5).

B.4.1.31. N-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}benzamida, 6

Seguendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 82 mg (0,40 mmol) de **27**, 50 mg (0,37 mmol) de HOBt, 71 mg (0,37 mmol) del clorhidrato de EDC y 38 mg (0,31 mmol) de ácido benzoico, se obtuvieron 103 mg (Rto. 83%) de **6**.



p.f. 113-115 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 \rightarrow 9:1.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3270 (NH), 1655 (NHCO), 1596, 1545, 1492 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,31 (s, 6H, 2CH_3), 2,74 (t, $J = 6,6$, 2H, CH_2N), 4,26 (t, $J = 6,6$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,42 (d, $J = 8,5$, 1H, H_7), 7,49-7,60 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5), 7,75 (dd, $J = 8,5$; 2,0, 1H, H_6), 7,90-7,96 (m, 3H, H_4 , H_2 , H_6), 8,01 (s, 1H, H_2), 8,21 (s, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,4 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,6 (2CH_3), 58,6 (CH_2N), 109,6 (C_4), 112,4 (C_7), 117,5 (C_6), 127,1 (C_2 , C_6), 128,8 (C_3 , C_5), 131,4 (C_1), 131,8 (C_4), 132,8; 135,2; 144,0 (C_{3a} , C_5 , C_{7a}), 144,2 (C_2), 165,9 (CO).

EM (ESI): 308,8 (M) $^+$, 309,8 (M+H) $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$:

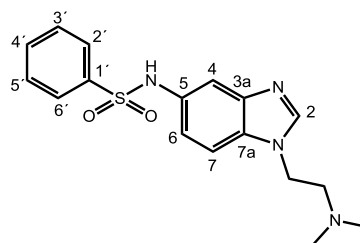
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 69,95; H: 6,50; N: 18,03.

B.4.1.32. N-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}bencenosulfonamida, 8

Seguendo el método A del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 82 mg (0,40 mmol) de **27**, 71 mg (0,40 mmol, 51 μL) de cloruro de bencenosulfonilo y 41 mg (0,40 mmol, 56 μL) de trietilamina, se obtuvieron 98 mg (Rto. 71%) de **8**.



p.f. 178-180 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 \rightarrow 9:1.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3067, 2942 (NH), 1497, 1460 (Ar), 1328, 1160 (NHSO_2).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,29 (s, 6H, 2CH₃), 2,71 (t, J = 6,6, 2H, CH₂N), 4,21 (t, J = 6,6, 2H, CH₂Nbencimidazol), 6,65 (sa, 1H, NH), 7,22 (dd, J = 8,7, J = 1,8, 1H, H₆), 7,32 (d, J = 8,8, 1H, H₇), 7,33 (d, J = 1,8, 1H, H₄), 7,42 (t, J = 7,8, 2H, H₃, H₅), 7,52 (t, J = 7,5, 1H, H₄), 7,73 (d, J = 8,1, 2H, H₂, H₆), 8,00 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,4 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 58,5 (CH₂N), 110,0 (C₄), 115,7; 120,4 (C₆, C₇), 127,3 (C₂, C₆), 129,0 (C₃, C₅), 130,7; 132,5 (C₅, C_{7a}), 132,9 (C₄), 139,0; 143,8 (C_{3a}, C₁), 144,5 (C₂).

EM (ESI): 344,7 (M)⁺, 345,8 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₇H₂₀N₄O₂S:

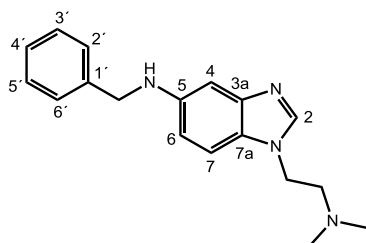
C: 59,28; H: 5,85; N: 16,27; S: 9,31.

Análisis encontrado:

C: 59,23; H: 5,93; N: 16,18; S: 9,17.

B.4.1.33. *N*-Bencil-1-[2-dimetilamino)etil]-1*H*-5-aminobencimidazol, 7

Seguendo el procedimiento general B.4.1.9 a partir de 47 mg (0,15 mmol) de **6** y 27 mg (0,70 mmol) de LiAlH₄, se obtuvieron 41 mg (Rto. 93%) de **7** (aceite).



Cromatografía: diclorometano:etanol 9:1.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3348, 3160, 3048 (NH), 1637, 1459, 1409 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,27 (s, 6H, 2CH₃), 2,70 (t, J = 6,3, 2H, CH₂N), 4,18 (t, J = 6,8, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,38 (s, 2H, CH₂NH), 6,64 (dd, J = 8,6; 2,0, 1H, H₆), 7,04 (d, J = 2,0, 1H, H₄), 7,20 (d, J = 8,6, 1H, H₇), 7,27-7,43 (m, 6H, H₇, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 7,84 (s, 1H, H₂).

EM (ESI): 295,0 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₈H₂₂N₄·3HCl·2H₂O:

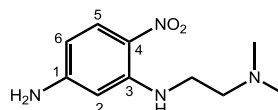
C: 49,16; H: 6,65; N: 12,74.

Análisis encontrado:

C: 49,01; H: 6,67; N: 12,57.

B.4.1.34. *N*³-[2-(Dimetilamino)etil]-4-nitrobenceno-1,3-diamina, 28

Seguendo el procedimiento general B.4.1.6 a partir de 640 mg (4,10 mmol) de 3-fluoro-4-nitroanilina, 325 mg (3,69 mmol, 0,4 mL) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 1,02 g (7,38 mmol) de K₂CO₃, se obtuvieron 550 mg (Rto. 60%) de **28** (aceite).



Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

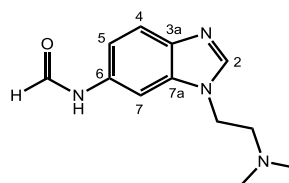
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3444, 3352, 3231 (NH₂, NH), 1568 (NO₂), 1621, 1507, 1465 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,34 (s, 6H, 2CH₃), 2,66 (t, J = 6,5, 2H, CH₂N), 3,32 (q, J = 6,4, 2H, CH₂NH), 4,31 (sa, 2H, NH₂), 5,88 (d, J = 2,3, 1H, H₂), 6,00 (dd, J = 9,2; 2,3, 1H, H₆), 8,05 (sa, 1H, NH), 8,09 (d, J = 9,2, 1H, H₅).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 40,9 (CH₂NH), 45,4 (2CH₃), 57,5 (CH₂N), 94,1; 104,9; 129,8 (C₂, C₄, C₅, C₆), 148,0; 153,6 (C₁, C₃).

B.4.1.35. *N*-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-6-il}formamida, 29

Seguendo el procedimiento general B.4.1.7 a partir de 605 mg (2,70 mmol) de **28**, 108 mg de Pd(C) al 10% y 22 g (0,48 mol, 18 mL) de ácido fórmico, se obtuvieron 430 mg (Rto. 69%) de **29** (aceite).



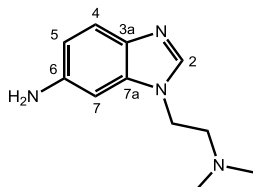
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3247 (NHCO), 1675 (NHCO), 1623, 1602, 1550, 1498, 1458 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,31 (s, 6H, 2CH₃), 2,74 (t, *J* = 6,5, 2H, CH₂N), 4,22-4,27 (m, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,81 (sa, 1H, NH), 6,97 (dd, *J* = 8,6; 2,0, 1/2H, H₅), 7,02 (dd, *J* = 8,6; 2,0, 1/2H, H₅), 7,13 (d, *J* = 1,9, 1/2H, H₇), 7,72 (d, *J* = 8,6, 1/2H, H₄), 7,78 (d, *J* = 8,6, 1/2H, H₄), 8,00 (s, 1/2H, CHO), 8,02 (s, 1/2H, CHO), 8,22 (d, *J* = 1,9, 1/2H, H₇), 8,44 (s, 1/2H, H₂), 8,45 (s, 1/2H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,2; 43,4 (CH₂Nbencimidazol), 45,6; 45,7 (2CH₃), 58,5; 58,6 (CH₂N), 101,0; 102,0; 114,9; 115,6; 120,5; 121,5 (C₄, C₅, C₇), 132,4; 132,9; 134,1; 140,7; 141,7 (C_{3a}, C₆, C_{7a}), 144,0; 144,2 (C₂), 159,3; 163,2 (CHO).

B.4.1.36. Síntesis de 1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-6-aminobencimidazol, **30**

A una disolución de 420 mg (1,8 mmol) de **29** en 10,8 mL de tetrahidrofurano anhidro, bajo atmósfera de argón, se le añaden 10,8 mL de H₂SO₄ 4 M y la reacción se mantiene a 50 °C durante 1 hora. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se elimina el tetrahidrofurano a presión reducida, el residuo se basifica con NaOH 2 M y se extrae con diclorometano (4 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 365 mg (Rto. 99%) de **30** (aceite), que se utiliza en la siguiente reacción sin necesidad de purificación.



IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3335, 2926 (NH₂), 1617, 1497, 1458, 1362 (Ar).

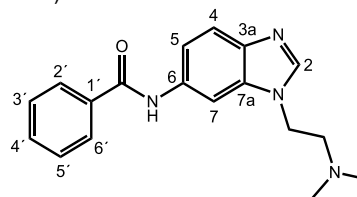
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,30 (s, 6H, 2CH₃), 2,69 (t, *J* = 6,9, 2H, CH₂N), 3,65 (sa, 2H, NH₂), 4,13 (t, *J* = 6,9, 2H,

CH₂Nbencimidazol), 6,65-6,70 (m, 2H, H₅, H₇), 7,56 (d, *J* = 8,4, 1H, H₄), 7,78 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,5 (CH₂Nbencimidazol), 46,1 (2CH₃), 58,8 (CH₂N), 94,9; 112,6; 121,3 (C₄, C₅, C₇), 135,3; 137,8; 143,3 (C_{3a}, C₆, C_{7a}), 142,2 (C₂).

B.4.1.37. N-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-6-il}benzamida, **10**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 270 mg (1,32 mmol) de **30**, 162 mg (1,20 mmol) de HOBT, 230 mg (1,20 mmol) del clorhidrato de EDC y 122 mg (1,00 mmol) de ácido benzoico, se obtuvieron 247 mg (Rto. 80%) de **10**.



p.f. 115-117 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3268, 2943 (NH), 1654 (NHCO), 1601, 1543, 1495 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,35 (s, 6H, 2CH₃), 2,80 (t, *J* = 6,5, 2H, CH₂N), 4,30 (t, *J* = 6,5, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,10 (dd, *J* = 8,5; 1,8, 1H, H₅), 7,55 (t, *J* = 7,5, 2H, H_{3'}, H₅), 7,60 (t, *J* = 7,4, 1H, H₄), 7,77 (d, *J* = 8,5, 1H, H₄), 7,94 (d, *J* = 7,4, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 8,02 (s, 1H, H₂), 8,05 (sa, 1H, NH), 8,40 (sa, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 43,1 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 58,4 (CH₂N), 101,6 (C₇), 115,2 (C₅), 120,5 (C₄), 127,0 (C_{2'}, C_{6'}), 128,9 (C_{3'}, C_{5'}), 131,9 (C_{4'}), 133,6, 134,1, 135,0, 140,6 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{1'}), 143,9 (C₂), 165,8 (CO).

EM (ESI): 308,8 (M)⁺, 309,8 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₈H₂₀N₄O:

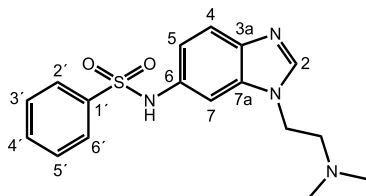
C: 70,11; H: 6,54; N: 18,17.

Análisis encontrado:

C: 70,21; H: 6,73; N: 17,88.

B.4.1.38. *N*-{1-[2-(Dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-6-il}bencenosulfonamida, **12**

Siguiendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 96 mg (0,47 mmol) de **30**, 75 mg (0,94 mmol, 76 μ L) de piridina y 86 mg (0,49 mmol, 62 μ L) de cloruro de bencenosulfonilo, se obtuvieron 41 mg (Rto. 25%) de **12**.



p.f. 138-140 °C.

Cromatografía: diclorometano \rightarrow diclorometano:etanol 9:1.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3249, 3063 (NH), 1494, 1466 (Ar), 1314, 1159 (NHSO_2).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,29 (s, 6H, 2CH₃), 2,69 (t, J = 6,4, 2H, CH₂N), 4,20 (t, J = 6,4, 2H, CH₂Nbencimidazol), 6,75 (dd, J = 8,5; 1,9, 1H, H₅), 7,36-7,41 (m, 3H, H₇, H_{3'}, H_{5'}), 7,51 (t, J = 7,4, 1H, H_{4'}), 7,58 (d, J = 8,6, 1H, H₄), 7,79 (d, J = 7,4, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7,99 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,5 (CH₂Nbencimidazol), 45,9 (2CH₃), 58,7 (CH₂N), 105,6 (C₇), 118,7 (C₅), 121,2 (C₄), 127,6 (C_{2'}, C_{6'}), 129,3 (C_{3'}, C_{5'}), 133,3 (C_{4'}), 131,9; 134,6; 139,3; 142,4 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{1'}), 144,7 (C₂).

EM (ESI): 345,1 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₇H₂₀N₄O₂S:

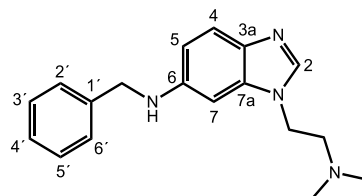
C: 59,28; H: 5,85; N: 16,27; S: 9,31.

Análisis encontrado:

C: 58,73; H: 5,89; N: 16,35; S: 8,97.

B.4.1.39. *N*-Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-6-aminobenzimidazol, **11**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.9 a partir de 62 mg (0,20 mmol) de **10** y 35 mg (0,93 mmol) de LiAlH₄, se obtuvieron 53 mg (Rto. 90%) de **11** (aceite).



Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5 \rightarrow 9:1.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3314, 3045, 2963 (NH), 1623, 1515, 1460 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,25 (s, 6H, 2CH₃), 2,63 (t, J = 7,0, 2H, CH₂N), 4,11 (t, J = 6,5, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,39 (s, 2H, CH₂NH), 6,48 (d, J = 2,0, 1H, H₇), 6,67 (dd, J = 8,6; 2,1, 1H, H₅), 7,27 (t, J = 7,5, 1H, H_{4'}), 7,35 (t, J = 7,6, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7,40 (d, J = 7,6, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7,57 (d, J = 8,6, 1H, H₄), 7,74 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,1 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 49,1 (CH₂NH), 58,4 (CH₂N), 91,2 (C₇), 111,3 (C₅), 120,9 (C₄), 127,3 (C_{4'}), 127,6 (C_{2'}, C_{6'}), 128,7 (C_{3'}, C_{5'}), 135,0; 136,7; 139,3; 145,1 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{1'}), 141,3 (C₂).

EM (ESI): 295,2 (M+H)⁺.

Análisis calculado para C₁₈H₂₂N₄·3HCl·4H₂O:

C: 45,43; H: 6,99; N: 11,77.

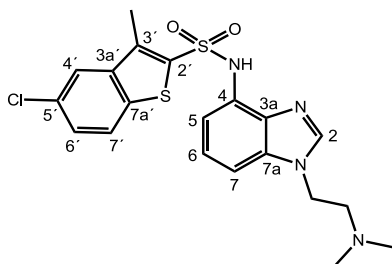
Análisis encontrado:

C: 45,61; H: 6,63; N: 11,56.

B.4.1.40. Bencimidazolsulfonamidas, **31-39**

• 5-Cloro-*N*-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-4-il}-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonamida, **31**

Siguiendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 100 mg (0,49 mmol) de **24**, 143 mg (0,51 mmol) de cloruro de 5-cloro-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonilo y 76 mg (0,98 mmol, 77 μ L) de piridina, se obtuvieron 69 mg (Rto. 31%) de **31**.



p.f. 90-93 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3224, 3101, 2927 (NH), 1738, 1664, 1592, 1499, 1464, 1414 (Ar), 1340, 1159 (NHSO_2).

$^1\text{H-RMN}$ (MeOD , δ): 2,22 (s, 6H, 2NCH_3), 2,46 (s, 3H, CH_3), 2,70 (t, $J = 6,6$, 2H, CH_2N), 4,30 (t, $J = 6,6$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,23 (t, $J = 8,0$, 1H, H_6), 7,32-7,38 (m, 3H, H_5 , H_7 , H_6), 7,74- 7,76 (m, 2H, H_4 , H_7), 8,04 (s, 1H, H_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 12,3 (CH_3), 43,5 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,5 (2NCH_3), 58,4 (CH_2N), 106,1 (C_7), 112,1 (C_5), 123,2; 123,5; 123,6; 127,5 (C_6 , C_4 , C_6 , C_7), 128,1; 131,2; 134,5; 135,2; 136,7; 136,8; 137,8; 140,7 (C_4 , C_{3a} , C_{7a} , C_2 , C_3 , C_5 , $\text{C}_{3a'}$, $\text{C}_{7a'}$), 143,4 (C_2).

EM (ESI): 449,0 [$\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$, 451,0 [$\text{M}^{(37)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$:

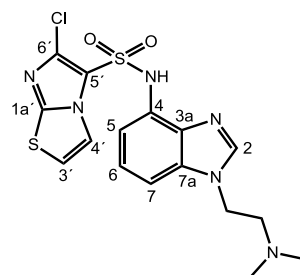
C: 53,50; H: 4,71; N: 12,48; S: 14,28.

Análisis encontrado:

C: 53,13; H: 4,79; N: 12,98; S: 14,03.

• 6-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-4-il}imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonamida, **32**

Seguendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 80 mg (0,39 mmol) de **24**, 105 mg (0,41 mmol) de cloruro de 6-cloroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonilo y 62 mg (0,78 mmol, 63 μL) de piridina, se obtuvieron 33 mg (Rto. 20%) de **32**.



p.f. 71-74 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3326, 3117, 2925 (NH), 1741, 1667, 1591, 1494, 1460 (Ar), 11267, 1123 (NHSO_2).

$^1\text{H-RMN}$ (MeOD , δ): 2,27 (s, 6H, 2CH_3), 2,74 (t, $J = 6,6$, 2H, CH_2N), 4,33 (t, $J = 6,6$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,20-7,40 (m, 4H, H_5 , H_6 , H_7 , H_3), 7,87 (d, $J = 4,1$, 1H, H_4), 8,03 (s, 1H, H_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (MeOD , δ): 43,9 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,6 (2CH_3), 59,1 (CH_2N), 109,1 (C_7), 116,2; 116,6; 121,8; 124,5 (C_5 , C_6 , C_3 , C_4), 120,3; 136,0; 138,2; 140,3; 151,5 (C_4 , C_{3a} , C_{7a} , C_5 , C_6 , $\text{C}_{1a'}$), 144,9 (C_2).

EM (ESI): 425,0 [$\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$, 427,0 [$\text{M}^{(37)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$:

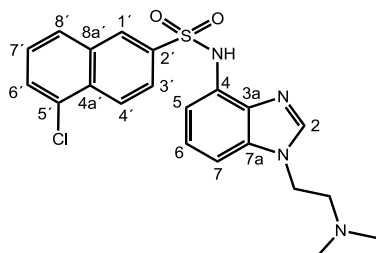
C: 45,22; H: 4,03; N: 19,78; S: 15,09.

Análisis encontrado:

C: 45,13; H: 4,09; N: 19,47; S: 15,03.

• 5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-4-il}naftaleno-2-sulfonamida, **33**

Seguendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 100 mg (0,49 mmol) de **24**, 134 mg (0,51 mmol) de cloruro de 5-cloronaftaleno-2-sulfonilo y 76 mg (0,98 mmol, 77 μL) de piridina, se obtuvieron 104 mg (Rto. 50%) de **33**.



p.f. 76-78 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3093, 2927 (NH), 1743, 1657, 1594, 1567, 1537, 1500, 1466, 1415 (Ar), 1330, 1159 (NHSO_2).

^1H -RMN (MeOD , δ): 2,08 (s, 6H, 2CH_3), 2,56 (t, $J = 6,6$, 2H, CH_2N), 4,16 (t, $J = 6,6$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,11 (d, $J = 7,7$, 1H, H_7), 7,16 (t, $J = 7,2$, 1H, H_6), 7,29 (d, $J = 7,5$, 1H, H_5), 7,41 (t, $J = 8,0$, 1H, H_7'), 7,60 (d, $J = 6,9$, 1H, H_6'), 7,78 (d, $J = 8,0$, 1H, H_8'), 7,83 (d, $J = 9,0$, 1H, H_3'), 7,91 (s, 1H, H_2), 8,10 (d, $J = 8,9$, 1H, H_4'), 8,33 (s, 1H, H_1).

^{13}C -RMN (MeOD , δ): 43,9 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,6 (CH_3), 59,0 (CH_2N), 108,1 (C_7), 114,9; 124,6; 125,0; 126,5; 128,7; 129,7; 130,1 (C_5 , C_6 , C_1' , C_3' , C_4' , C_6' , C_7' , C_8'), 133,1; 133,2; 134,6; 139,6 (C_{3a} , C_4 , C_{7a} , C_2' , C_{4a}' , C_5' , C_{8a}'), 144,6 (C_2).

EM (ESI): 429,0 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$, 431,0 [$\text{M}^{(37}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$:

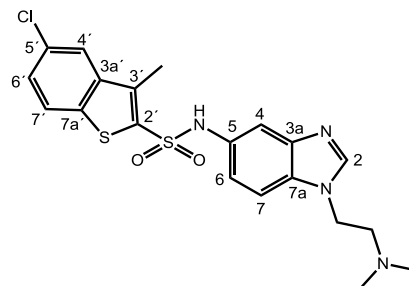
C: 58,80; H: 4,93; N: 13,06; S: 7,48.

Análisis encontrado:

C: 58,35; H: 4,85; N: 12,96; S: 7,02.

• 5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonamida, **34**

Seguendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 67 mg (0,33 mmol) de **27**, 97 mg (0,35 mmol) de cloruro de 5-cloro-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonilo y 52 mg (0,66 mmol, 53 μL) de piridina, se obtuvieron 48 mg (Rto. 33%) de **34**.



p.f. 162-164 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3075, 2947 (NH), 1497, 1465 (Ar), 1330, 1156 (NHSO_2).

^1H -RMN (MeOD , δ): 2,16 (s, 6H, 2NCH_3), 2,52 (s, 3H, CH_3), 2,60 (t, $J = 6,2$, 2H, CH_2N), 4,26 (t, $J = 6,2$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 7,00 (dd, $J = 8,6$; 2,0, 1H, H_6), 7,37 (d, $J = 1,9$, 1H, H_4), 7,51 (d, $J = 8,6$, 1H, H_7), 7,55 (dd, $J = 8,6$; 2,0, 1H, H_6'), 7,98 (d, $J = 1,9$, 1H, H_4'), 8,04 (d, $J = 8,6$, 1H, H_7'), 8,18 (s, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (MeOD , δ): 11,8 (CH_3), 42,1 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,0 (2NCH_3), 57,9 (CH_2N), 110,7; 113,2; 118,0; 123,4; 124,7; 127,4 (C_4 , C_6 , C_7 , C_4' , C_6' , C_7'), 130,4; 130,5; 131,9; 136,0; 136,6; 137,1; 140,4; 143,4 (C_{3a} , C_5 , C_{7a} , C_2' , C_3' , C_{3a}' , C_5' , C_{7a}'), 145,3 (C_2).

EM (ESI): 448,9 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$, 450,8 [$\text{M}^{(37}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$:

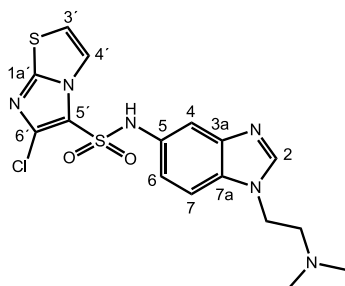
C: 53,50; H: 4,71; N: 12,48; S: 14,28.

Análisis encontrado:

C: 52,95; H: 4,81; N: 12,75; S: 14,09.

• 6-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonamida, **35**

Seguendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 86 mg (0,42 mmol) de **27**, 113 mg (0,44 mmol) de cloruro de 6-cloroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonilo y 66 mg (0,83 mmol, 67 μL) de piridina, se obtuvieron 36 mg (Rto. 20%) de **35**.



p.f. 99-101 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3117, 2924 (NH), 1742, 1542, 1500, 1462 (Ar), 1462, 1248 (NHSO₂).

¹H-RMN (MeOD, δ): 2,17 (s, 6H, 2CH₃), 2,65 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂N), 4,24 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,00 (dd, *J* = 8,7; 2,0, 1H, H₆), 7,18 (d, *J* = 4,5, 1H, H₃), 7,32 (d, *J* = 1,8, 1H, H₄), 7,38 (d, *J* = 8,7, 1H, H₇), 7,68 (d, *J* = 4,5, 1H, H_{4'}), 8,07 (s, 1H, H₂).

¹³C-RMN (MeOD, δ): 43,9 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 59,1 (CH₂N), 111,9 (C₄), 115,0; 116,5; 120,7; 121,5 (C₆, C₇, C_{3'}, C_{4'}), 120,0; 132,6; 133,4; 138,6; 144,3; 151,4 (C₅, C_{3a}, C_{7a}, C_{5'}, C_{6'}, C_{1a}), 146,3 (C₂).

EM (ESI): 425,1 [M(³⁵Cl)+H]⁺, 427,1 [M(³⁷Cl)+H]⁺.

Análisis calculado para C₁₆H₁₇ClN₆O₂S₂:

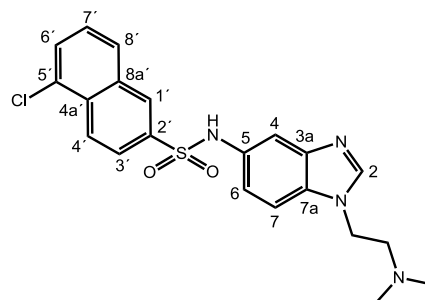
C: 45,22; H: 4,03; N: 19,78; S: 15,09.

Análisis encontrado:

C: 45,77; H: 3,95; N: 19,31; S: 15,28.

• **5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}naftaleno-2-sulfonamida, 36**

Siguiendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 204 mg (1,00 mmol) de **27**, 273 mg (1,05 mmol) de cloruro de 5-cloronaftaleno-2-sulfonilo y 158 mg (2,0 mmol, 0,16 mL) de piridina, se obtuvieron 296 mg (Rto. 69%) de **36**.



p.f. 92-95 °C.

Cromatografía: diclorometano:etanol 9,5:0,5.

IR (KBr, cm⁻¹): 3092, 2948, 2827 (NH), 1591, 1495, 1467 (Ar), 1327, 1157 (NHSO₂).

¹H-RMN (CD₃OD, δ): 2,23 (s, 6H, 2CH₃), 2,70 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂N), 4,29 (t, *J* = 6,6, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,11 (dd, *J* = 8,7; 1,9, 1H, H₆), 7,36 (d, *J* = 1,8, 1H, H₄), 7,42 (d, *J* = 8,9, 1H, H₇), 7,47 (t, *J* = 8,0, 1H, H_{7'}), 7,69 (dd, *J* = 7,5; 1,0, 1H, H_{6'}), 7,82 (d, *J* = 9,0, 1H, H₈), 7,85 (dd, *J* = 9,0; 1,8, 1H, H₃), 8,12 (s, 1H, H₂), 8,25-8,27 (m, 2H, H_{1'}, H_{4'}).

¹³C-RMN (CD₃OD, δ): 43,8 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2CH₃), 59,1 (CH₂N), 111,7 (C₄), 114,6; 120,7; 125,0; 126,6; 128,7; 129,7; 130,0; 130,1 (C₆, C₇, C_{1'}, C_{3'}, C_{4'}, C_{6'}, C_{7'}, C_{8'}), 132,9; 133,0; 133,2; 133,7; 134,7; 139,0; 144,2 (C_{3a}, C₅, C_{7a}, C_{2'}, C_{4a'}, C_{5'}, C_{8a'}), 146,0 (C₂).

EM (ESI): 429,1 [M(³⁵Cl)+H]⁺, 431,1 [M(³⁷Cl)+H]⁺.

Análisis calculado para C₂₁H₂₁ClN₄O₂S:

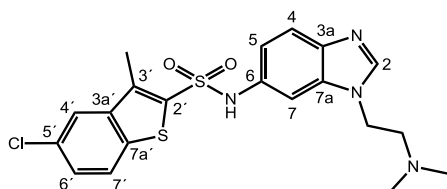
C: 58,80; H: 4,93; N: 13,06; S: 7,48.

Análisis encontrado:

C: 58,75; H: 5,02; N: 12,99; S: 7,41.

• **5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-6-il}-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonamida, 37**

Siguiendo el método B del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 101 mg (0,49 mmol) de **30**, 145 mg (0,51 mmol) de cloruro de 5-cloro-3-metil-1-benzotiofeno-2-sulfonilo y 78 mg (0,99 mmol, 80 μL) de piridina, se obtuvieron 61 mg (Rto. 28%) de **37**.



p.f. 114-115°C.

Cromatografía: diclorometano/diclorometano:etanol 7:3.

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3045, 2945 (NH), 1466 (Ar), 1343, 1155 (NHSO_2).

^1H -RMN (CD_3OD , δ): 2,09 (s, 6H, 2NCH₃), 2,27 (s, 3H, CH₃), 2,53 (t, 2H, $J = 6,7$, CH₂N), 4,18 (t, $J = 6,7$, 2H, CH₂Nbencimidazol), 6,93 (dd, $J = 8,6$; 1,9, 1H, H₅), 7,26 (d, $J = 1,8$, 1H, H₇), 7,35 (dd, $J = 8,7$; 2,0, 1H, H₆), 7,42 (d, $J = 8,7$, 1H, H₄), 7,71 (d, $J = 2,4$, 1H, H₄), 7,73 (d, $J = 4,0$, 1H, H₇), 8,03 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CD_3OD , δ): 12,2 (CH₃), 43,8 (CH₂Nbencimidazol), 45,6 (2NCH₃), 58,9 (CH₂N), 106,1 (C₇), 120,0; 120,6; 124,4; 125,0; 128,8 (C₄, C₅, C_{4'}, C_{6'}, C_{7'}), 132,6; 133,7; 134,9; 137,8; 137,9; 139,1; 142,0; 142,1 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{2'}, C_{3'}, C_{3a'}, C_{5'}, C_{7a'}), 145,9 (C₂).

EM (ESI): 449,0 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$]⁺, 451,0 [$\text{M}^{(37}\text{Cl})+\text{H}$]⁺.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$:

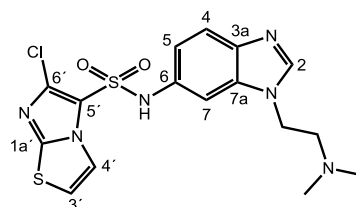
C: 53,50; H: 4,71; N: 12,48; S: 14,28.

Análisis encontrado:

C: 53,39; H: 4,82; N: 12,67; S: 14,32.

- 6-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-bencimidazol-6-il}imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonamida, **38**

Siguiendo el método C del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 96 mg (0,47 mmol) de **30**, 125 mg (0,49 mmol) de cloruro de 6-cloroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-sulfonilo y 111 mg (1,32 mmol) de NaHCO_3 , se obtuvieron 76 mg (Rto. 38%) de **38**.



p.f. 139-141 °C.

Cromatografía: diclorometano/diclorometano:etanol 7:3.

IR (KBr , cm^{-1}): 3117, 2928, 2859 (NH), 1596, 1459 (Ar), 1355, 1144 (NHSO_2).

^1H -RMN (CD_3OD , δ): 2,32 (s, 6H, 2CH₃), 2,74 (t, $J = 6,5$, 2H, CH₂N), 4,33 (t, $J = 6,5$, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,00 (dd, $J = 8,5$; 1,4, 1H, H₅), 7,31 (d, $J = 4,4$, 1H, H₃), 7,37 (d, $J = 1,2$, 1H, H₇), 7,52 (d, $J = 8,6$, 1H, H₄), 7,81 (d, $J = 4,4$, 1H, H₄), 8,16 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CD_3OD , δ): 43,6 (CH₂Nbencimidazol), 45,5 (2CH₃), 58,9 (CH₂N), 105,8 (C₇), 116,7; 119,6; 120,8; 121,4 (C₄, C₅, C_{3'}, C_{4'}), 119,9; 133,3; 135,0; 138,7; 142,1; 151,4 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{1a'}, C_{5'}, C_{6'}), 146,3 (C₂).

EM (ESI): 425,1 [$\text{M}^{(35}\text{Cl})+\text{H}$]⁺, 427,1 [$\text{M}^{(37}\text{Cl})+\text{H}$]⁺.

Análisis calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$:

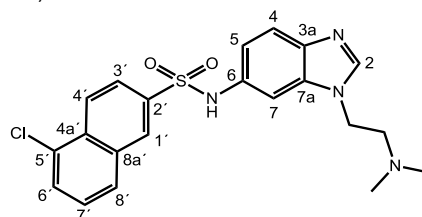
C: 45,22; H: 4,03; N: 19,78; S: 15,09.

Análisis encontrado:

C: 45,49; H: 4,20; N: 19,40; S: 14,97.

- 5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-bencimidazol-6-il}naftaleno-2-sulfonamida, **39**

Siguiendo el método C del procedimiento general B.4.1.8 a partir de 101 mg (0,49 mmol) de **30**, 135 mg (0,52 mmol) de cloruro de 5-cloronaftaleno-2-sulfonilo y 116 mg (1,37 mmol) de NaHCO_3 , se obtuvieron 49 mg (Rto. 23%) de **39**.



p.f. 170 °C (descompone).

Cromatografía: diclorometano/diclorometano:etanol 7:3.

IR (KBr, cm^{-1}): 3429, 3064, 2877 (NH), 1625, 1592, 1501, 1466 (Ar), 1322, 1157 (NH SO_2).

^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 2,00 (s, 6H, 2CH_3), 2,38 (t, 2H, $J = 6,1$, CH_2N), 4,16 (t, 2H, $J = 6,1$, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 6,92 (dd, $J = 8,6$; 1,8, 1H, H_5), 7,22 (d, $J = 1,8$, 1H, H_7), 7,45 (d, $J = 8,6$, 1H, H_4), 7,60 (t, $J = 8,0$, 1H, H_7), 7,85 (d, $J = 6,9$, 1H, H_6), 7,94 (dd, $J = 9,0$; 1,8, 1H, H_3), 8,08-8,12 (m, 2H, H_2 , H_8), 8,31 (d, 1H, $J = 9,0$, H_4), 8,47 (d, $J = 1,8$, 1H, H_7), 10,37 (sa, 1H, NH).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 42,1 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 44,9 (2CH_3), 57,7 (CH_2N), 103,5 (C_7), 116,8; 119,7; 123,9; 125,4; 128,0; 128,5; 128,9; 129,1 (C_4 , C_5 , C_1' , C_3' , C_4' , C_6' , C_7' , C_8), 130,6; 131,1; 132,0; 132,9; 133,7; 137,6; 140,8 (C_{3a} , C_6 , C_{7a} , C_2' , C_{4a} , C_5' , C_{8a}), 144,8 (C_2).

EM (ESI): 429,2 [$\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$, 431,2 [$\text{M}^{(37)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$:

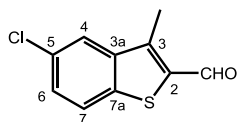
C: 58,80; H: 4,93; N: 13,06; S: 7,48.

Análisis encontrado:

C: 58,71; H: 5,05; N: 12,97; S: 7,40.

B.4.1.41. Síntesis de 5-cloro-3-metilbenzotiofeno-2-carbaldehído, **44**⁷⁷

A una disolución de 947 mg (5,20 mmol) de 5-cloro-3-metilbenzo[b]tiofeno en 16 mL de tetrahydrofurano anhidro a -78 °C bajo atmósfera de argón, se le añade una solución de *n*-BuLi (6,20 mmol, 2,6 mL, 2,4 M en hexano). Tras 1 hora, se añaden 0,85 mL (10,90 mmol) de dimetilformamida y la mezcla se mantiene a reflujo 1 hora. La reacción se finaliza por adición de NH_4Cl acuoso y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se separan las fases y se extrae la acuosa con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan, se secan y se concentran, obteniéndose 1,1 g (Rto. 97%) de **44**.



p.f. 177-179°C (lit.⁷⁷ = 176-179 °C).

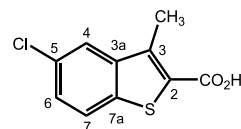
IR (KBr, cm^{-1}): 1653 (CO), 1454 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,79 (s, 3H, CH_3), 7,49 (dd, $J = 8,6$; 2,0, 1H, H_6), 7,82 (d, $J = 8,6$, 1H, H_7), 7,88 (d, $J = 2,0$, 1H, H_4), 10,36 (s, 1H, CHO).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 12,1 (CH_3), 123,4 (C_4), 124,4 (C_7), 128,8 (C_6), 131,3; 139,2; 140,1; 141,3; 141,8 (C_2 , C_3 , C_{3a} , C_5 , C_{7a}), 183,8 (CHO).

B.4.1.42. Síntesis del ácido 5-cloro-3-metil-1-benzotiofeno-2-carboxílico, **45**⁸³

A una disolución de 557 mg (2,65 mmol) de **44** en 5 mL de *tert*-butanol se le añade, gota a gota, una disolución acuosa de 2,05 g (22,7 mmol) de NaClO_2 y 2,08 g (17,3 mmol) de NaH_2PO_4 y la mezcla se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. Se eliminan los disolventes a presión reducida. El residuo se acidifica y el precipitado obtenido se filtra, proporcionando 382 mg (Rto. 56%) de **45**, en forma de clorhidrato.



p.f. 288-290 °C (lit.⁸³ = 300-303 °C).

IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3337 (OH), 1453 (Ar).

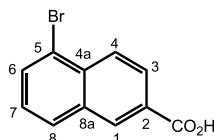
^1H -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 2,75 (s, 3H, CH_3), 7,56 (dd, $J = 8,6$; 1,8, 1H, H_6), 8,03 (d, $J = 1,8$, 1H, H_4), 8,04 (d, $J = 8,6$, 1H, H_7), 10,35 (s, 1H, COOH).

^{13}C -RMN ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, δ): 13,5 (CH_3), 124,1 (C_4), 125,5 (C_7), 128,1 (C_6), 130,7; 138,6; 142,2 (C_2 , C_3 , C_{3a} , C_5 , C_{7a}), 164,9 (COOH).

B.4.1.43. Síntesis del ácido 5-bromo-2-naftoico, **46**⁷⁸

Una disolución de 5,0 g (31,29 mmol) de Br_2 y 0,15 g (catalítico) de I_2 en 5 mL de ácido acético se añade gota a gota sobre una disolución de 5,0 g (29,06 mmol) de ácido 2-naftoico en 20 mL de ácido acético a 118 °C durante 20 minutos y la mezcla de reacción se agita a esa

temperatura durante 1 hora. Tras enfriar la mezcla a 60 °C, el sólido resultante se filtra y se lava con agua caliente (3 x 30 mL). El residuo se seca a 60 °C y se recristaliza de metanol, obteniéndose 2,4 g (Rto. 33%) de **46**.



p.f. 268-270 °C (lit.⁷⁸ = 267-269 °C).

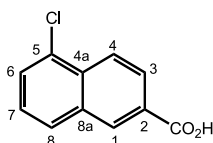
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3449 (OH), 1698 (CO), 1500, 1465 (Ar).

¹H-RMN (Me₂SO-*d*₆, δ): 7,56 (t, *J* = 7,9, 1H, H₇), 8,04 (dd, *J* = 7,5; 0,9, 1H, H₆), 8,15 (dd, *J* = 8,9; 1,7, 1H, H₃), 8,22 (d, *J* = 8,2, 1H, H₈), 8,24 (d, *J* = 8,9, 1H, H₄), 8,69 (d, *J* = 1,4, 1H, H₁), 13,32 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (Me₂SO-*d*₆, δ): 121,6 (C₅), 126,9 (C₄), 127,0 (C₃), 127,6 (C₇), 129,1 (C₂), 129,7 (C₈), 131,1 (C₁), 132,3 (C₆), 133,0; 133,6 (C_{4a}, C_{8a}), 167,0 (COOH).

B.4.1.44. Síntesis del ácido 5-cloro-2-naftoico, **47**⁷⁶

Se disuelven 286 mg (1,14 mmol) de **46** y 373 mg (3,73 mmol) de CuCl en 3 mL de dimetilsulfóxido anhidro en un tubo sellado y se calienta en un reactor de microondas durante 6 min a 200 °C. La mezcla se diluye con 20 mL de acetato de etilo y se filtra a través de celita. La fase orgánica se lava sucesivamente con agua (20 mL), HCl 1 N (20 mL), una solución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL) y NaCl (2 x 20 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y los disolventes se eliminan a presión reducida, obteniéndose 227 mg (Rto. 96%) de **47**.



p.f. 263-266°C (lit.⁷⁶ = 263-265 °C).

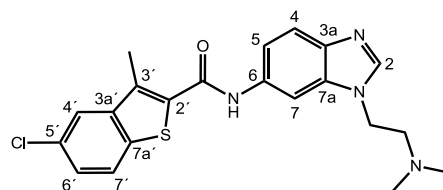
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3445 (OH), 1700 (CO), 1623, 1598, 1558, 1468 (Ar).

¹H-RMN (Me₂SO-*d*₆, δ): 7,57 (t, *J* = 7,8, 1H, H₇), 7,80 (dd, *J* = 7,5; 1,0, 1H, H₆), 8,11 (dd, *J* = 8,8; 1,7, 1H, H₃), 8,15 (d, *J* = 8,5, 1H, H₈), 8,22 (d, *J* = 8,4, 1H, H₄), 8,64 (d, *J* = 1,5, 1H, H₁), 13,30 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (Me₂SO-*d*₆, δ): 124,3 (C₄), 127,3 (C₇), 127,8 (C₈), 128,5 (C₆), 128,7 (C₂), 129,4 (C₃), 130,9 (C₁), 131,8; 134,2 (C_{4a}, C₅, C_{8a}), 168,2 (COOH).

B.4.1.45. 5-Cloro-*N*-(1-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-bencimidazol-6-il)-3-metilbencotiofeno-2-carboxamida, **40**

Siguiendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 50 mg (0,22 mmol) de **45**, 36 mg (0,27 mmol) de HOBT, 52 mg (0,27 mmol) del clorhidrato de EDC y 59 mg (0,29 mmol) de **30**, se obtuvieron 82 mg (Rto. 90%) de **40**.



p.f. 127-130 °C.

Cromatografía: diclorometano/diclorometano:etanol 8:2.

IR (KBr, cm⁻¹): 3257, 2943 (NH), 1648 (NHCO), 1542, 1494 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2,28 (s, 6H, 2NCH₃), 2,69 (s, 3H, CH₃), 2,71 (t, *J* = 6,4, 2H, CH₂N), 4,21 (t, *J* = 6,4, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,07 (dd, *J* = 8,6; 2,0, 1H, H₅), 7,40 (dd, *J* = 8,6; 2,0, 1H, H₆), 7,70 (d, *J* = 6,2, 1H, H₇), 7,72-7,75 (m, 2H, H₄, H_{4'}), 7,97 (s, 1H, H₂), 8,13 (sa, 1H, NH), 8,25 (d, *J* = 1,5, 1H, H₇).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 13,1 (CH₃), 43,1 (CH₂Nbencimidazol), 45,5 (2NCH₃), 58,4 (CH₂N), 101,8 (C₇), 115,4 (C₅), 120,5 (C₄), 123,0; 123,7; 127,2 (C_{4'}, C_{6'}, C_{7'}), 131,4; 132,5; 133,2; 134,1; 135,7; 136,6; 140,9; 141,7 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C_{2'}, C_{3'}, C_{3a'}, C_{5'}, C_{7a'}), 144,1 (C₂), 161,4 (NHCO).

EM (ESI): 413,7 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$, 415,7 $[M(^{37}\text{Cl})+H]^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{OS}$:

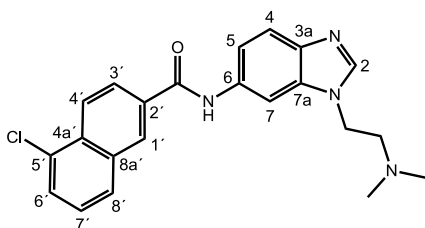
C: 61,08; H: 5,13; N: 13,57.

Análisis encontrado:

C: 61,48; H: 5,51; N: 13,77.

B.4.1.46. 5-Cloro-N-{1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-6-il}-2-naftanamida, 42

Seguendo el procedimiento general B.4.1.4 a partir de 26 mg (0,13 mmol) de **47**, 20 mg (0,15 mmol) de HOBt, 28 mg (0,15 mmol) del clorhidrato de EDC y 34 mg (0,17 mmol) de **30**, se obtuvieron 37 mg (Rto. 73%) de **42**.



p.f. 87-89 °C.

Cromatografía: diclorometano: etanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (KBr, cm^{-1}): 3297, 2925 (NH), 1657 (NHCO), 1600, 1544, 1495 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,30 (s, 6H, 2CH₃), 2,75 (t, $J = 6,5$, 2H, CH₂N), 4,25 (t, $J = 6,5$, 2H, CH₂Nbencimidazol), 7,15 (dd, $J = 8,6$; 1,9, 1H, H₅), 7,47 (t, $J = 7,9$, 1H, H₇), 7,67 (d, $J = 7,4$; 0,8, 1H, H₆), 7,74 (d, $J = 8,6$, 1H, H₄), 7,85 (d, $J = 8,3$, 1H, H₃), 7,99 (s, 1H, H₂), 8,05 (dd, $J = 8,8$; 1,7, 1H, H₈), 8,34-8,43 (m, 4H, H₇, H₁, H₄, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 43,0 (CH₂Nbencimidazol), 45,4 (2CH₃), 58,2 (CH₂N), 101,9 (C₇), 115,6 (C₅), 120,3 (C₄), 124,7; 125,3; 126,8; 127,9; 128,0; 128,1 (C₁, C₃, C₄, C₆, C₇, C₈), 132,0; 132,1; 133,0; 133,7; 133,8; 134,0; 140,6 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C₂, C_{4a}, C₅, C_{8a}), 143,8 (C₂), 165,5 (NHCO).

EM (ESI): 393,8 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$, 395,8 $[M(^{37}\text{Cl})+H]^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}$:

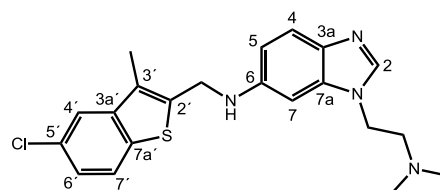
C: 67,26; H: 5,39; N: 14,26.

Análisis encontrado:

C: 67,04; H: 5,43; N: 14,09.

B.4.1.47. N-[(5-Cloro-3-metil-1-benzotiofen-2-il)metil]-1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-6-amina, 41

Seguendo el procedimiento general B.4.1.9 a partir de 83 mg (0,20 mmol) de **40** y 35 mg (0,93 mmol) de LiAlH₄, se obtuvieron 45 mg (Rto. 56%) de **41**.



p.f. 160-162 °C.

Cromatografía: diclorometano: metanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (KBr, cm^{-1}): 3268, 2924 (NH), 1627, 1587, 1503, 1458 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,25 (s, 6H, 2CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,67 (t, $J = 6,9$, 2H, CH₂N), 4,16 (t, $J = 6,9$, 2H, CH₂Nbencimidazol), 4,61 (s, 2H, CH₂NH), 6,60 (d, $J = 2,0$, 1H, H₇), 6,69 (dd, $J = 8,6$; 2,1, 1H, H₅), 7,26 (dd, $J = 8,5$; 2,0, 1H, H₆), 7,59 (d, $J = 8,6$, 1H, H₄), 7,62-7,68 (m, 2H, H₄, H₇), 7,78 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 12,2 (CH₃), 43,3; 43,5 (CH₂NH, CH₂Nbencimidazol), 45,8 (2CH₃), 58,6 (CH₂N), 92,2 (C₇), 111,9 (C₅), 121,4; 121,6; 123,8; 124,9 (C₄, C₄, C₆, C₇), 127,8; 130,8; 135,3; 137,1; 140,2; 142,5; 144,9 (C_{3a}, C₆, C_{7a}, C₂, C₃, C_{3a}, C₅, C_{7a}), 141,9 (C₂).

EM (ESI): 399,1 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$, 401,1 $[M(^{37}\text{Cl})+H]^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{S}\cdot 3\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

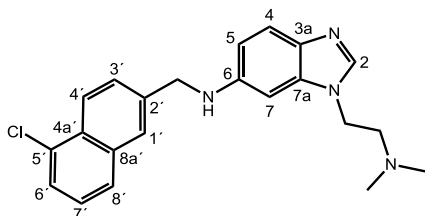
C: 46,34; H: 5,56; N: 10,29; S: 5,89.

Análisis encontrado:

C: 46,50; H: 5,33; N: 10,11; S: 5,39.

B.4.1.48. N-[(5-Cloro-2-naftil)metil]-1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-benzimidazol-6-amina, 43

Seguendo el procedimiento general B.4.1.9 a partir de 59 mg (0,15 mmol) de **42** y 26 mg (0,69 mmol) de LiAlH₄, se obtuvieron 29 mg (Rto. 50%) de **43**.



p.f. 110-112 °C.

Cromatografía: diclorometano: metanol 9,5:0,5 → 9:1.

IR (KBr, cm^{-1}): 3277, 2927 (NH), 1627, 1502, 1462 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2,17 (s, 6H, 2CH_3), 2,57 (t, 2H, $J = 6,9$, CH_2N), 4,09 (t, $J = 6,9$, 2H, $\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 4,58 (s, 2H, CH_2NH), 6,49 (d, $J = 2,1$, 1H, H_7), 6,71 (dd, $J = 8,7$; 2,1, 1H, H_5), 7,37 (t, $J = 7,9$, 1H, H_7), 7,54 (dd, $J = 7,4$; 0,9, 1H, H_3), 7,58 (d, $J = 8,7$, 1H, H_4), 7,64 (dd, $J = 8,7$; 1,6, 1H, H_6), 7,70-7,86 (m, 3H, H_2 , H_1 , H_8), 8,25 (d, $J = 8,7$, 1H, H_4).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 42,9 ($\text{CH}_2\text{Nbencimidazol}$), 45,4 (2CH_3), 48,9 (CH_2NH), 58,2 (CH_2N), 91,5 (C_7), 111,4 (C_5), 120,9; 125,0; 126,0; 126,1; 126,8; 127,0; 128,4 (C_4 , C_1 , C_3 , C_4 , C_6 , C_7 , C_8), 130,2; 131,9; 134,7; 135,0; 136,7; 138,0; 145,0 (C_{3a} , C_6 , C_{7a} , C_2 , C_{4a} , C_5 , C_{8a}), 141,3 (C_2).

EM (ESI): 379,2 [$\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$, 381,2 [$\text{M}^{(37)\text{Cl}} + \text{H}$] $^+$.

Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_4 \cdot 3\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:

C: 48,72; H: 5,95; N: 10,33.

Análisis encontrado:

C: 48,85; H: 5,67; N: 10,39.

B.4.2. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE RADIOLIGANDO

Los experimentos de desplazamiento de radioligando se han llevado a cabo en placas de 96 pocillos (Optiplat), utilizando un contador de centelleo 1450 MicroBeta Trilux (PerkinElmer), un aparato de filtración múltiple a vacío Filtermat

Harvester (PerkinElmer), láminas de centelleo MeltiLex A (PerkinElmer) y un pH-metro CRISON (micro pH 2001). El radioligando [^3H]LSD (79,2 Ci/mmol) y las membranas de células HEK-293 que sobreexpresan el receptor 5-HT $_6$ se han adquirido en PerkinElmer.

La incubación se finaliza por filtración rápida a vacío utilizando filtros Filtermat A (Wallac), pretratados con polietilenimina al 0,5%. Los filtros se lavan de tres a cinco veces con 500 μL de tampón Tris-HCl frío (pH 7,4 a 25 °C), y se calientan a 80 °C hasta su fusión, se dejan enfriar y finalmente se mide la radiactividad unida a las membranas empleando un contador de centelleo.

Todos los ensayos de inhibición competitiva se han realizado de dos a cuatro veces de forma independiente por triplicado. Los datos fueron analizados por un procedimiento de ajuste de curva iterativo (programa Prisma, Graph Pad), que proporcionó los valores de CI_{50} , K_i y r^2 de los compuestos ensayados, siendo calculados los valores de K_i con la ecuación de Cheng-Prusoff.⁷⁴

Las membranas del receptor h5-HT $_6$ se resuspenden a la concentración indicada por el fabricante en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,4). Se toman alícuotas que se congelan a -80 °C hasta el momento de su utilización. Fracciones de 20 μL de la suspensión de las membranas se incuban durante 60 min a 37 °C con [^3H]LSD 2,6 nM, en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 0,2 mL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con serotonina 500 μM y constituye menos del 10% de la unión total.

B.4.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA

Los efectos en la actividad de AC fueron determinados en CEREP,⁸⁴ de acuerdo con los métodos previamente descritos.³

Brevemente, las células CHO transfectadas con el h5-HT₆R se incuban a 37 °C durante 45 minutos con el ligando objeto de estudio, en ausencia o presencia de serotonina 300 nM, y la concentración de AMPc se determina por HTRF. La actividad de AC se expresa como porcentaje del efecto máximo obtenido con serotonina 10 µM. Los valores de CE₅₀ y CI₅₀ se calculan por análisis de regresión no lineal de las curvas de concentración-respuesta con el programa Hill desarrollado en CEREP.

B.4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN MICROSOMAS DE RATA Y HUMANOS

Los compuestos objeto de estudio se incuban a 37 °C a una concentración final de 1 µM ó 5 µM en tampón fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS), junto con dos soluciones de NADPH y MgCl₂ en PBS (a una concentración final de 2 mM y 5 mM, respectivamente). Las reacciones metabólicas son iniciadas por la adición de una suspensión de microsomas de hígado, RLMS (ratas Sprague-Dawley macho de Sigma-Aldrich) o HLMS (humanos), a una concentración final de proteína de 1 mg/mL. Tras agitar las soluciones en un vórtex, se colocan en un baño de agua abierto al aire y a 37 °C. Se toman siete alícuotas diferentes a tiempos entre 0 minutos y 1 hora (RLM) ó 2 horas (HLM) y se añaden sobre 100 µL de acetonitrilo frío. El sobrenadante se separa del precipitado por centrifugación a 10000g durante 5 minutos y se hace pasar a través de un filtro jeringa de teflón de tamaño de poro de 0,2 µm (Albet Labscience).

La pérdida relativa de compuesto en el curso de la incubación se monitoriza por HPLC-EM en un

espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL. La separación cromatográfica se lleva a cabo con una columna Agilent-Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 mm x 150 mm), junto con una precolumna (5 µm, 4,6 mm x 12,5 mm). La fase móvil empleada consiste en un gradiente de disoluciones A (agua:metanol 95:5) y B (metanol:agua 95:5) con 0,1 % de ácido fórmico y 0,1 % de hidróxido amónico como aditivos. En todos los casos se ha usado un flujo constante de 0,5 mL/min, un tiempo total de 15 minutos y el siguiente gradiente: 0 min, 60% A; 1 min, 100% B; 1-14 min, 100% B; 15 min, 60% A. El análisis de EM se ha llevado a cabo utilizando la técnica de ionización ESI en modo positivo SIM. El voltaje del capilar se ha establecido en 3,0 kV y el voltaje del fragmentador en 70 eV. La temperatura del gas de secado es de 350 °C, el flujo de 10 L/min y la presión del nebulizador de 20 psi.

Las concentraciones son cuantificadas midiendo el área bajo el pico (M+H⁺) y convertidas a porcentaje de compuesto remanente, usando el valor del área del pico de t = 0 como el 100%. El porcentaje de compuesto remanente frente al tiempo para cada compuesto se ajusta a una función de decaimiento exponencial, para determinar la constante de velocidad de primer orden y el t_{1/2} de degradación usando el programa Prism (GraphPad).

B.4.5. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CITOCROMO CYP2D6

Este ensayo ha sido realizado en Suven Life Sciences Limited (India).⁸⁵

Brevemente, se determina la actividad de la enzima humana CYP2D6 recombinante microsomal, expresada en células de insectos infectadas con baculovirus (BD Gentest Corp.) tras la incubación con el compuesto objeto de estudio (10 µM) durante 30 minutos. Como sustrato, se emplea AMMC (3 µM) y se determina la concentración del metabolito 3-[2-

(*N,N*-dietil-*N*-metilamonio)etil]-7-hidroxi-4-metilcumarina (AHMC) mediante fluorimetría (Spectra Max Gemini MS), utilizando quinidina como inhibidor control ($CI_{50} = 0,002 \mu M$). Los resultados se expresan como porcentaje de actividad remanente de la enzima respecto de la inicial.

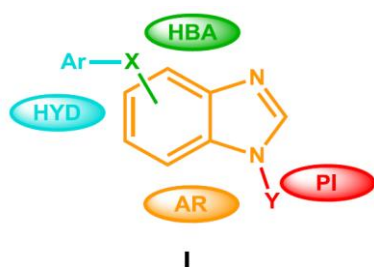
B.4.6. TEST DE MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

La capacidad pro-cognitiva del compuesto objeto de estudio se ha evaluado mediante el test de memoria de reconocimiento de objetos en Suven Life Sciences Limited (India), según los métodos previamente descritos.^{51,52,86,87}

Brevemente, para este estudio se utilizan ratas Wistar macho. El grupo control se trata con vehículo (2 mL/kg, *ip*) y los otros dos grupos son tratados con tacrina (0,5 mg/kg, *po*) o con el compuesto objeto de estudio (1 mg/kg, *ip*). Sesenta minutos después de la administración, se les permite a las ratas explorar arenas que contienen dos objetos similares (botellas de plástico de 12 cm de alto x 5 cm de diámetro) cubiertas con cinta adhesiva amarilla, durante 3 minutos y se registra el tiempo invertido por las ratas con los dos objetos. Al día siguiente, las ratas son sometidas a un ensayo de elección por un período de 3 minutos, sesenta minutos después de la administración de vehículo, tacrina o el compuesto objeto de estudio. A las ratas se les permite explorar la arena, que contiene una copia del objeto familiar y un objeto nuevo (botella de vidrio color ámbar, 11,5 cm de alto x 4,5 cm de diámetro). Se registran los tiempos dedicados a explorar el objeto nuevo y el familiar y se determinan las diferencias en los tiempos empleados por las ratas en investigar el objeto nuevo y el objeto familiar.

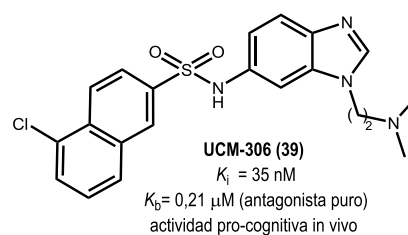
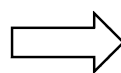
B.5. CONCLUSIONES

1. En el presente capítulo se ha abordado el desarrollo de nuevos ligandos del receptor serotoninérgico 5-HT₆, llevando a cabo los procesos de identificación de *hit(s)* y *hit to lead*. Así, a partir del modelo de farmacóforo elaborado en nuestro grupo con anterioridad, se diseñó y sintetizó una serie de derivados de bencimidazol **I** (**1-12**, **31-39**) en la que se consideraron diferentes subunidades estructurales como elementos farmacofóricos.



2. El compuesto UCM-306 (**39**) ha sido caracterizado como un antagonista puro del h5-HT₆R ($K_i = 35$ nM; $K_b = 0,21$ μ M), con buenas propiedades farmacocinéticas in vitro ($t_{1/2} > 1$ hora, inhibición de CYP2D6 = 22%).

3. El nuevo antagonista del 5-HT₆R identificado en este trabajo UCM-306 ha mostrado actividad en un modelo de memoria, lo que sugiere su posible aplicabilidad terapéutica en trastornos cognitivos.



1. Monsma, F.J., Jr.; Shen, Y.; Ward, R.P.; Hamblin, M.W.; Sibley, D.R. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 320-327.
2. Ruat, M.; Traiffort, E.; Arrang, J.M.; Tardivel-Lacombe, J.; Diaz, J.; Leurs, R.; Schwartz, J.C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *193*, 268-276.
3. Kohen, R.; Metcalf, M.A.; Khan, N.; Druck, T.; Huebner, K.; Lachowicz, J.E.; Meltzer, H.Y.; Sibley, D.R.; Roth, B.L.; Hamblin, M.W. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 47-56.
4. Kohen, R.; Fashingbauer, L.A.; Heidmann, D.E.; Guthrie, C.R.; Hamblin, M.W. *Mol. Brain Res.* **2001**, *90*, 110-117.
5. Plassat, J.L.; Amlaiky, N.; Hen, R. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 229-236.
6. Sebben, M.; Ansanay, H.; Bockaert, J.; Dumuis, A. *Neuroreport* **1994**, *5*, 2553-2557.
7. Max, S.I.; Monsma, F.J., Jr.; Sibley, D.R. *J. Serotonin Res.* **1995**, *2*, 241-249.
8. Obosi, L.A.; Hen, R.; Beadle, D.J.; Bermúdez, I.; King, L.A. *FEBS Lett.* **1997**, *412*, 321-324.
9. Purohit, A.; Herrick-Davis, K.; Teitler, M. *Synapse* **2003**, *47*, 218-224.
10. Ward, R.P.; Hamblin, M.W.; Lachowicz, J.E.; Hoffman, B.J.; Sibley, D.R.; Dorsa, D.M. *Neuroscience* **1995**, *64*, 1105-1111.
11. Gérard, C.; Martres, M.P.; Lefevre, K.; Miquel, M.C.; Verge, D.; Lanfumey, L.; Doucet, E.; Hamon, M.; El Mestikawy, S. *Brain Res.* **1997**, *746*, 207-219.
12. Hamon, M.; Doucet, E.; Lefevre, K.; Miquel, M.C.; Lanfumey, L.; Insausti, R.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Verge, D. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21*, 68S-76S.
13. Hirst, W.D.; Minton, J.A.L.; Bromidge, S.M.; Moss, S.F.; Latter, A.J.; Riley, G.; Routledge, C.; Middlemiss, D.N.; Price, G.W. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1597-1605.
14. Roberts, J.C.; Reavill, C.; East, S.Z.; Harrison, P.J.; Patel, S.; Routledge, C.; Leslie, R.A. *Brain Res.* **2002**, *934*, 49-57.
15. Hirst, W.D.; Abrahamsen, B.; Blaney, F.E.; Calver, A.R.; Aloj, L.; Price, G.W.; Medhurst, A.D. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1295-1308.
16. Borsini, F.; Bordi, F.; Riccioni, T. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *98*, 169-172.
17. Davies, S.L.; Silvestre, J.S.; Guitart, X. *Drugs Fut.* **2005**, *30*, 479-495.
18. Sleight, A.J.; Boess, F.G.; Bos, M.; Levet-Trafit, B.; Riemer, C.; Bourson, A. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 556-562.
19. Bromidge, S.M.; Brown, A.M.; Clarke, S.E.; Dodgson, K.; Gager, T.; Grassam, H.L.; Jeffrey, P.M.; Joiner, G.F.; King, F.D.; Middlemiss, D.N.; Moss, S.F.; Newman, H.; Riley, G.; Routledge, C.; Wyman, P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 202-205.
20. Glennon, R.A.; Bondarev, M.; Roth, B. *Med. Chem. Res.* **1999**, *9*, 108-117.
21. Lee, M.; Rangisetty, J.B.; Dukat, M.; Slassi, A.; Maclean, N.; Lee, D.K.H.; Glennon, R.A. *Med. Chem. Res.* **2000**, *10*, 230-242.
22. Glennon, R.A.; Lee, M.; Rangisetty, J.B.; Dukat, M.; Roth, B.L.; Savage, J.E.; McBride, A.; Rauser, L.; Hufeisen, S.; Lee, D.K.H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1011-1018.
23. Tsai, Y.; Dukat, M.; Slassi, A.; MacLean, N.; Demchyshyn, L.; Savage, J.E.; Roth, B.L.; Hufeisen, S.; Lee, M.; Glennon, R.A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2295-2299.
24. Russell, M.G.N.; Baker, R.J.; Barden, L.; Beer, M.S.; Bristow, L.; Broughton, H.B.; Knowles, M.; McAllister, G.; Patel, S.; Castro, J.L. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3881-3895.

25. Slassi, A.; Isaac, M.; O'Brien, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*, 513-527.
26. Glennon, R.A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2795-2812.
27. Holenz, J.; Pauwels, P.J.; Diaz, J.L.; Merce, R.; Codony, X.; Buschmann, H. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 283-299.
28. Heal, D.J.; Smith, S.L.; Fisas, A.; Codony, X.; Buschmann, H. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *117*, 207-231.
29. Shireman, B.T.; Bonaventure, P.; Carruthers, N.I. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2008**, *43*, 25-42.
30. Liu, K.G.; Robichaud, A.J. *Drug Devel. Res.* **2009**, *70*, 145-168.
31. Glennon, R.A.; Siripurapu, U.; Roth, B.L.; Kolanos, R.; Bondarev, M.L.; Sikazwe, D.; Lee, M.; Dukat, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 579-595.
32. Marazziti, D.; Baroni, S.; Dell'osso, M.C.; Bordi, F.; Borsini, F. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2783-2790.
33. Bourson, A.; Borroni, E.; Austin, R.H.; Monsma, F.J.; Sleight, A.J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *274*, 173-180.
34. Sleight, A.J.; Boess, F.G.; Monsma, F.J.; Bourson, A. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **1996**, *6*, S4.
35. Mitchell, E.S.; Neumaier, J.F. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *108*, 320-333.
36. Johnson, C.N.; Ahmed, M.; Miller, N.D. *Curr. Opin Drug Discov. Devel.* **2008**, *11*, 642-654.
37. Geldenhuys, W.J.; Van der Schyf, C.J. *Curr. Top Med. Chem.* **2008**, *8*, 1035-1048.
38. Upton, N.; Chuang, T.T.; Hunter, A.J.; Virley, D.J. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 458-469.
39. King, M.V.; Marsden, C.A.; Fone, K.C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 482-492.
40. Fone, K.C. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 1015-1022.
41. Wilson, C.; Terry, A.V. *Drugs Fut.* **2009**, *34*, 969-975.
42. Hirano, K.; Piers, T.M.; Searle, K.L.; Miller, N.D.; Rutter, A.R.; Chapman, P.F. *Life Sci.* **2009**, *84*, 558-562.
43. Rossé, G.; Schaffhauser, H. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 207-221.
44. Codony, X.; Vela, J.M.; Ramirez, M.J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 94-100.
45. Sargent, B.J.; Moore, N.A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *68*, 852-860.
46. Woolley, M.L.; Bentley, J.C.; Sleight, A.J.; Marsden, C.A.; Fone, K.C. *Neuropharmacology* **2001**, *41*, 210-219.
47. Rogers, D.C.; Hagan, J.J. *Psychopharmacology* **2001**, *158*, 114-119.
48. Russell, M.G.; Dias, R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 643-654.
49. Lindner, M.D.; Hodges, D.B., Jr.; Hogan, J.B.; Orie, A.F.; Corsa, J.A.; Barten, D.M.; Polson, C.; Robertson, B.J.; Guss, V.L.; Gillman, K.W.; Starrett, J.E., Jr.; Gribkoff, V.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 682-691.
50. Meneses, A. *Behav. Brain Res.* **2001**, *118*, 107-110.
51. King, M.V.; Sleight, A.J.; Woolley, M.L.; Topham, I.A.; Marsden, C.A.; Fone, K.C. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 195-204.
52. Woolley, M.L.; Marsden, C.A.; Sleight, A.J.; Fone, K.C. *Psychopharmacology* **2003**, *170*, 358-367.

53. Dawson, L.A.; Nguyen, H.Q.; Li, P. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25*, 662-668.
54. Foley, A.G.; Murphy, K.J.; Hirst, W.D.; Gallagher, H.C.; Hagan, J.J.; Upton, N.; Walsh, F.S.; Regan, C.M. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29*, 93-100.
55. Marcos, B.; Chuang, T.T.; Gil-Bea, F.J.; Ramírez, M.J. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 434-440.
56. Hirst, W.D.; Stean, T.O.; Rogers, D.C.; Sunter, D.; Pugh, P.; Moss, S.F.; Bromidge, S.M.; Riley, G.; Smith, D.R.; Bartlett, S.; Heidbreder, C.A.; Atkins, A.R.; Lacroix, L.P.; Dawson, L.A.; Foley, A.G.; Regan, C.M.; Upton, N. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *553*, 109-119.
57. Pérez-García, G.; Meneses, A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *81*, 673-682.
58. Arnt, J.; Bang-Andersen, B.; Grayson, B.; Bymaster, F.P.; Cohen, M.P.; DeLapp, N.W.; Giethlen, B.; Kreilgaard, M.; McKinzie, D.L.; Neill, J.C.; Nelson, D.L.; Nielsen, S.M.; Poulsen, M.N.; Schaus, J.M.; Witten, L.M. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2010**, *13*, 1021-1033.
59. de Bruin, N.M.; Prickaerts, J.; van Loevezijn, A.; Venhorst, J.; de Groote, L.; Houba, P.; Reneerkens, O.; Akkerman, S.; Kruse, C.G. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, *96*, 392-402.
60. Kendall, I.; Sloten, H.A.; Codony, X.; Burgueño, J.; Pauwels, P.J.; Vela, J.M.; Fone, K.C. *Psychopharmacology* **2011**, *213*, 413-430.
61. Costa-Aze, V.D.S.; Dauphin, F.; Boulouard, M. *Behav. Brain Res.* **2011**, *222*, 134-140.
62. Bentley, J.C.; Bourson, A.; Boess, F.G.; Fone, K.C.; Marsden, C.A.; Petit, N.; Sleight, A.J. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126S* 66P, U38.
63. Julius, D.J.; Tecott, L.M.; Sun, L.M. *US5698766*.
64. Caldirola, P. *SMI Inaugural Conference on Obesity and Related Disorders*, **2003**, London.
65. Svartengren, J.; Axelsson-Lendin, P.; Edling, N.; Fhoelenhag, K.; Isacson, R.; Hillegaart, V.; Groenberg, A. 34th Annu. Meet. Soc. Neurosci. **2004**, Abstract 75.8.
66. Gannon, K.S.; Heal, D.J.; Cheetham, S.C.; Jackson, H.C.; Seeley, R.J.; Meléndez, R.; Fichman, M.; Rutkowski, J.V.; Shacham, S.; Orbach, P. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *101*, 124.
67. Fisas, A.; Codony, X.; Romero, G.; Dordal, A.; Giraldo, J.; Merce, R.; Holenz, J.; Heal, D.; Buschmann, H.; Pauwels, P.J. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 973-983.
68. López-Rodríguez, M.L.; Benhamú, B.; de la Fuente, T.; Sanz, A.; Pardo, L.; Campillo, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4216-4219.
69. de la Fuente, T. *Diseño y desarrollo de nuevos antagonistas del receptor serotoninérgico 5-HT₆. Estudio de la interacción ligando-receptor*. Universidad Complutense de Madrid, 2009.
70. de la Fuente, T.; Martín-Fontecha, M.; Sallander, J.; Benhamú, B.; Campillo, M.; Medina, R.A.; Pellissier, L.P.; Claeysen, S.; Dumuis, A.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M.L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1357-1369.
71. Williams, A.; Salvadori, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1972**, 883-889.
72. Liu, Z.; Li, H.; Zhao, Q.; Shen, J. *Heterocycles* **2008**, *75*, 1907-1911.
73. Nosenko, Y.; Kunitski, M.; Stark, T.; Gobel, M.; Tarakeshwar, P.; Brutschy, B. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 11403-11411.
74. Cheng, Y.; Prusoff, W.H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
75. Canada, E.J.; Gosset, L.S.; Mantelo, N.B.; Shi, Q.; Wang, M.; Warshawsky, A.M.; Xu, Y. WO2005/054176.

76. Alessi, T.R.; Lombardo, L.J.; Ellingboe, J.W.; Dolak, T.M. EP393941A1.

77. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Itoh, F.; Tanaka, T.; Hara, T.; Miki, H.; Iwasaki, M.; Aono, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2251-2273.

78. Öztasın, N.; Göksu, S.; Seçen, H. *Synth. Commun.* **2011**, *41*, 2017-2024.

79. White, A.W.; Almassy, R.; Calvert, A.H.; Curtin, N.J.; Griffin, R.J.; Hostomsky, Z.; Maegley, K.; Newell, D.R.; Srinivasan, S.; Golding, B.T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4084-4097.

80. Wilks, A.F.; Bu, X.; Burns, C. WO 2003/099811A1.

81. Hara, H.; Maruyama, T.; Saito, M.; Takeuchi, M.; Mase, T. DE3425151A1.

82. Hunger, A.; Kebrle, J.; Rossi, A.; Hoffmann, K. *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 1032-1046.

83. Dickinson, R.P.; Iddon, B. *Int. J. Sulfur Chem.* **1973**, *8*, 233-242.

84. <http://www.cerep.fr/Cerep/Users/index.asp>.

85. <http://www.suven.com/>.

86. Scali, C.; Giovannini, M.G.; Prosperi, C.; Bartolini, L.; Pepeu, G. *Pharmacol. Res.* **1997**, *36*, 463-469.

87. Moser, P.C.; Bergis, O.E.; Jegham, S.; Lochead, A.; Duconseille, E.; Terranova, J.P.; Caille, D.; Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F.; Fischmeister, R.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; George, P.; Soubrie, P.; Scatton, B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 731-741.

CHAPTER A: NEW 5-HT₇ RECEPTOR ANTAGONISTS

A.1. Background

Many important functional roles for the serotonin 5-HT₇ receptor (5-HT₇R) have been reported in various pathophysiological processes, such as sleep disturbances, depression, migraine and pain. This receptor is also involved in thermoregulation and endocrine function, learning and memory.¹⁻⁶ Nevertheless, to date there have not been many 5-HT₇R ligands in clinical development programs, and current and future research should determine whether a ligand of this receptor is suitable as a therapeutic agent.

A.2. Aims

In the course of a program aimed at the discovery of new potent and selective 5-HT₇R ligands, we postulated a ligand-based pharmacophore model for 5-HT₇R antagonism.^{7,8} The model consists of five features: a positive ionizable atom (PI), a H-bonding acceptor group (HBA), and three hydrophobic regions (HYD₁-HYD₃) at the distances shown in Figure 1a. Analogue UCM-5600 (*K_i* = 89 nM) was identified as a hit for the search of new 5-HT₇R ligands (Figure 1b).⁸ In the present work, we have carried out the hit to lead and lead optimization processes, considering a new set of compounds of general structure I with structural modifications at the different pharmacophoric elements present in UCM-5600 (Figure 1b).

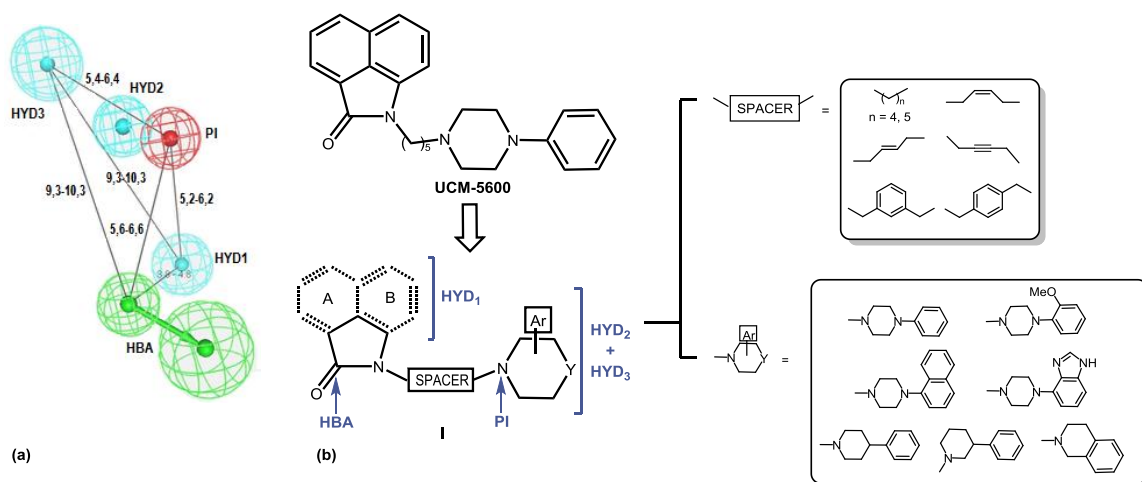


Figure 1. (a) Pharmacophore model proposed for 5-HT₇R antagonism. (b) Hit compound UCM-5600 and designed compounds of general structure I.

A.3. Results and discussion

As a first step new compounds **I** (**1-20**) were synthesized and assessed for binding affinities at human 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. In this series derivative **18** [HYD₁ = 1,3-dihydro-2H-indol-2-one; spacer = -(CH₂)₄; HYD₂ + HYD₃ = 3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl] exhibited the highest 5-HT₇R affinity (*K_i* = 7 nM) and the best selectivity 5-HT₇/5-HT_{1A} ratio (31-fold).⁹

Compound **18** was evaluated for functional activity at the 5-HT₇R by measuring its effect on AC activity in CHO cells transfected with the receptor, using serotonin and mesulergine as reference agonist and antagonist, respectively. The results shown in Table 1 indicated that ligand **18** (UCM-3307) acts as a partial agonist of the h5-HT₇R, so it was selected as a lead for optimization in search of new potent 5-HT₇R antagonists.

Computational simulations of the complexes between compounds **1** and β_2 -based 3-D models of both 5-HT receptors have permitted us to study the influence of the different structural features in terms of 5-HT₇R affinity and selectivity over the 5-HT_{1A}R. This study has provided valuable information about the molecular details of the ligand-receptor interaction in this family of compounds and has

allowed us to propose a hypothesis for 5-HT₇/5-HT_{1A} receptor selectivity. Thus, based on postulated structural requirements, a new set of compounds **1** (**40-46**) was designed and synthesized in which both the spacer of four to seven methylene units and the small size of the isoquinoline systems should afford a high 5-HT₇R affinity and selectivity versus the 5-HT_{1A}R (Figure 2).

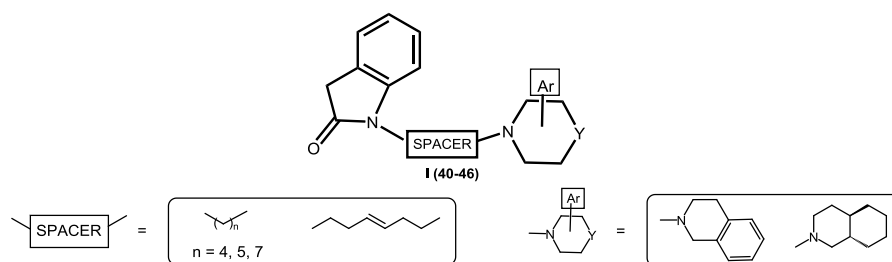


Figure 2

Table 1. Binding affinities and functional activities of the new serotonin h5-HT₇R ligands identified.

Ligand	$K_i \pm \text{SEM}$ (nM)		$\text{EC}_{50} \pm \text{SEM}$ (μM)	Maximum activation effect (%)	IC_{50} (μM)	K_b (nM)	Maximum inhibitory effect (%)
	5-HT ₇	5-HT _{1A}					
UCM-3307 (18)	7 ± 2	219 ± 11	0.31 ± 0.04	40 ± 1	> 10	---	43 ± 4
UCM-20509 (42)	0.7 ± 1	> 1000	0.21 ± 0.04	21 ± 1	2.2	84	81 ± 2
UCM-26709 (46)	2.7 ± 1	> 1000	0.061 ± 0.003	36 ± 1	2.3	88	66 ± 2
5-HT	---	---	0.016 ± 0.001	---	---	---	---
mesulergine	---	---	---	---	0.20 ± 0.08	12 ± 1	---

The new compounds exhibited high affinity for the 5-HT₇R and were inactive at the 5-HT_{1A}R, which supports the proposed hypothesis. In particular, compounds **42** (UCM-20509) and **46** (UCM-26709) with optimized profiles of 5-HT₇R affinity ($K_i = 0.7$ and 2.7

nM, respectively) and 5-HT₇/5-HT_{1A} selectivity (ratio = 1428 and 370, respectively) were identified (Table 1). Ligands **42** and **46** were pharmacologically characterized as 5-HT₇R antagonists ($K_b = 84$ and 88 nM, respectively) (Table 1).

Optimized leads **42** and **46** were also assessed for metabolic stability using rat and human liver microsomes

(RLMs and HLMs). The data shown in Table 2 indicate moderate half-life time values ($t_{1/2} \sim 11$ -19 min).

Table 2. Pharmacokinetic properties in silico and in vitro of new serotonin h5-HT₇R antagonists identified.

Ligand	Molar mass (free base)	cLogP	tPSA (Å ²)	$t_{1/2}$ in RLM (min)	$t_{1/2}$ in HLM (min)
UCM-20509 (42)	346.47	3.982	23.55	10.6	13.2
UCM-26709 (46)	352.51	4.754	23.55	13.9	18.7

According to this promising profile, the antidepressant activity of antagonist **42** (UCM-20509) was explored in animal models using the tail suspension and the forced swim tests, in collaboration with Dr. Peter Hedlund, at the Scripps Research Institute.

Together, the behavior of identified 5-HT₇R antagonist UCM-20509 (**42**) in these in vivo models shows the interest of this compound and its potential therapeutic applicability in depression disorders (Figure 3).

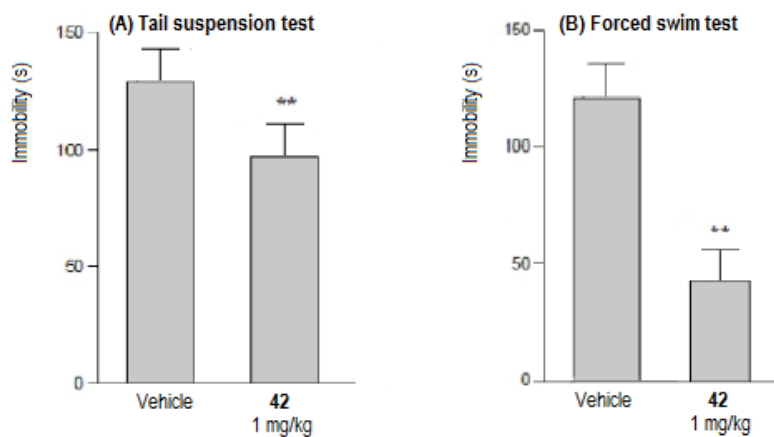


Figure 3. Effects of UCM-20509 (**42**) on immobility in the tail suspension test (A) and the swim forced test (B). **P < 0.01 indicate significant reduction of immobility vs the vehicle. N = 7-9 animals/group.

CHAPTER B: NEW 5-HT₆ RECEPTOR ANTAGONISTS

B.1. Background

The serotonin 5-HT₆ receptor (5-HT₆R) function is associated with the control of cholinergic neurotransmission, which prompted much interest into the possible implication of the receptor in cognitive impairment (memory and learning), related to neurological diseases such as Alzheimer's.¹⁰⁻¹⁴ More recently, the 5-HT₆R has emerged as a promising target for the treatment of obesity and related metabolic syndrome, a disease with an increasing global prevalence and high unmet clinical need. Clearly, there is much evidence that the h5-HT₆R is involved in the pathogenesis of CNS diseases related to cognitive or eating disorders, so it appears to be an attractive therapeutic target that should be exploited for drug development.

B.2. Aims

Since the appearance of the first ligands in 1998, the number of patent applications and scientific publications concerning the 5-HT₆R experienced a dizzying growth, mostly in the past few years. At present, several research

groups from both academia and the pharmaceutical industry have contributed to the development of structurally different 5-HT₆R agonists and antagonists, which have been used as pharmacological tools to study the receptor. However, no 5-HT₆R ligand has been marketed so far and the search for new compounds acting at this receptor remains an area of high interest for medicinal chemists, aiming at either highly selective agents or compounds combining 5-HT₆R activity with other serotonin activities thought to be beneficial for the treatment of CNS disorders.

In this context, we are involved in a project aimed at the development of new serotonin 5-HT₆R ligands using a rational approach. As a starting point, using Catalyst software, we generated a ligand-based pharmacophore model for 5-HT₆R antagonism (Figure 4).¹⁵ Based on this model, we designed two series of benzimidazole derivatives of general structures I and II (Figure 4).

In series II, during the identification of hit(s), hit to lead and lead optimization processes, compound UCM-258 has been characterized as a potent 5-HT₆R antagonist ($K_b = 5$ nM).^{16,17} In the present work, we pretend to develop compounds of series I.

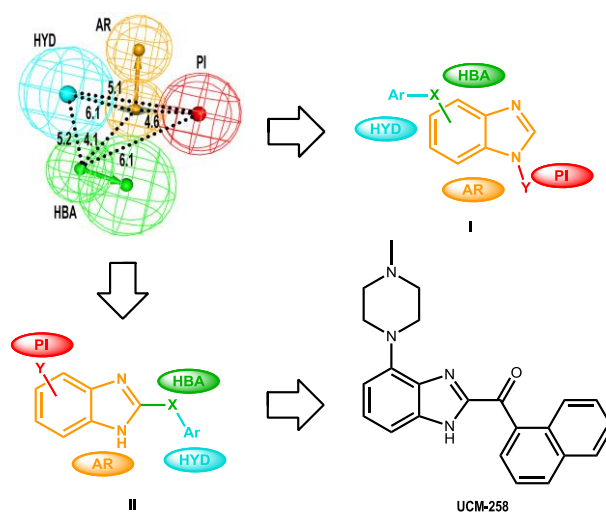


Figure 4. General structures I and II designed based on the pharmacophore model for 5-HT₆R antagonists.

B.3. Results and discussion

An initial series of compounds **1** (**1-12**) was synthesized considering different X groups at 4, 5 and 6 positions of the benzimidazole ring (Figure 5). In vitro binding affinities at the h5-HT₆R revealed that only compounds with a sulfonamide group (X = NHSO₂) showed moderate affinity, regardless the position in the benzimidazole ring. Therefore sulfonamides **4** (K_i =

0.73 μ M), **8** (K_i = 0.64 μ M) and **12** (K_i = 0.60 μ M) were selected as hits for the development of new 5-HT₆R antagonists.

In the optimization process, new sulfonamides **1** (**31-39**) were synthesized containing representative aromatic systems (Ar) present in reported 5-HT₆R ligands (Figure 5).

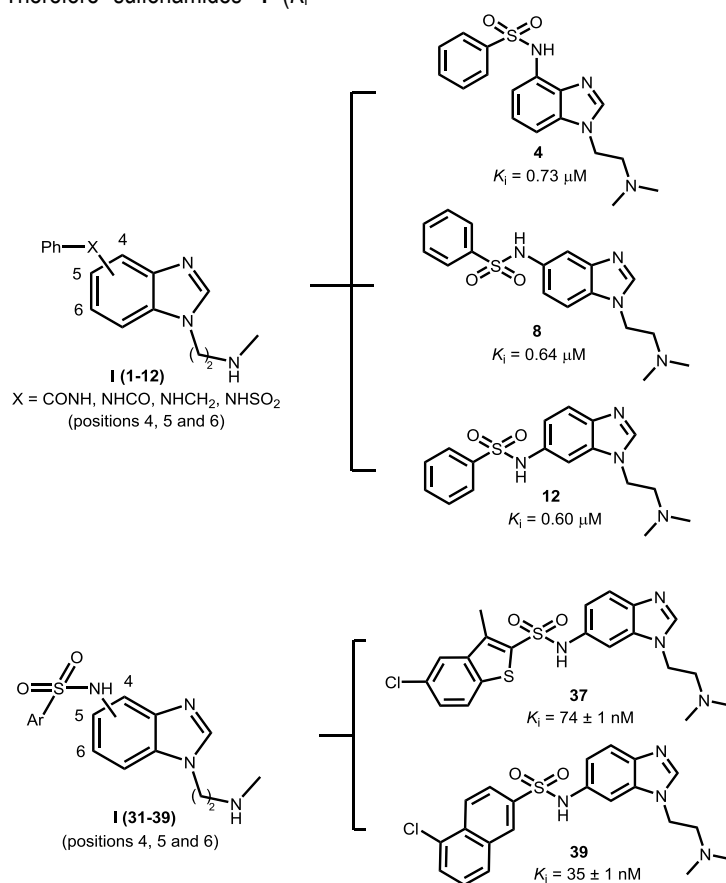


Figure 5. Hit to lead and lead optimization processes for new serotonin 5-HT₆R ligands **1**.

High-affinity compound **39** (K_i = 35 nM) was selected as a lead for functional characterization in the h5-HT₆R and evaluation of pharmacokinetic properties. The functional activity of ligand **39** (UCM-306) was assessed by determination of its effect on AC activity in COS7 cells transfected with the h5-

HT₆R, using serotonin (EC_{50} = 81 nM) and methiothepin (IC_{50} = 13 nM) as reference agonist and antagonist, respectively. The results indicate that compound **39** acts as a pure antagonist of the h5-HT₆R, with IC_{50} = 1.40 μ M and K_b = 0.21 μ M (maximum inhibitory effect = 87%).

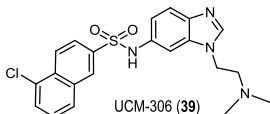
The new antagonist **39** was also assessed for metabolic stability using RLMs and HLMs. Interestingly, a $t_{1/2}$ greater than 1 hour ($t_{1/2}$ = 78 min, Table 3) was observed for the new antagonist.

Additionally, an *in vitro* fluorescence-based inhibition assay was carried out with cytochrome CYP2D6, one of the most important enzymes involved in drug metabolism. Notably, after 1-hour incubation with compound UCM-306 at a concentration of 10 μ M, remaining activity of 78% was determined for CYP2D6 (Table 4).

Altogether, these pharmacokinetic studies indicate that the new 5-HT₆R antagonist UCM-306 (**39**) displays a good metabolic profile *in vitro*. Therefore, UCM-306 was evaluated for its potential *in vivo* pro-cognitive activity using the novel object recognition task (NORT) in Wistar rats and tacrine as positive control, a drug used to improve cognitive symptoms associated with Alzheimer's disease.

The results of these studies (Figure 6) reveal the pro-cognitive activity of the 5-HT₆R antagonist UCM-306 (**39**) identified in this work, suggesting its possible therapeutic applicability in cognitive disorders.

Table 4. Pharmacokinetic properties *in vitro* of the new serotonin h5-HT₆R antagonist identified.

Ligand	Molar mass (free base)	cLogP	tPSA (Å ²)	$t_{1/2}$ in RLM (min)	$t_{1/2}$ in HLM (min)	CYP2D6 remaining activity (%)
 UCM-306 (39)	428.94	4.54	65.01	20.7	78	78

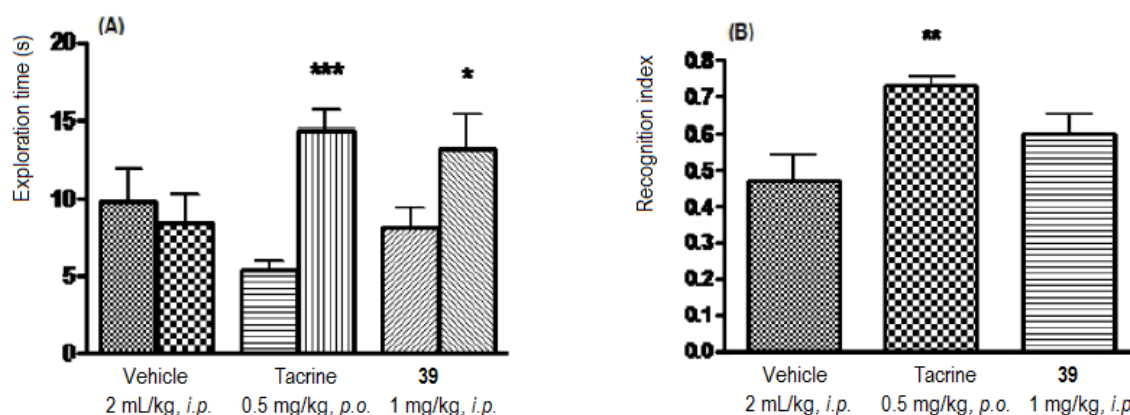


Figure 6. Effects of UCM-306 (**39**) in the NORT test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ indicate significant difference of the new object exploration vs the familiar object. $N = 7-10$ animals/group.

Bibliography

1. Hedlund, P.B.; Huitron-Resendiz, S.; Henriksen, S.J.; Sutcliffe, J.G. *Biol. Psychiatry* **2005**, *58*, 831-837.
2. Sarkisyan, G.; Roberts, A.J.; Hedlund, P.B. *Behav. Brain Res.* **2010**, *209*, 99-108.
3. Belmaker, R.H.; Agam, G. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 55-68.
4. Pérez-García, G.; Meneses, A. *Behav. Brain Res.* **2009**, *202*, 102-113.
5. Terrón, J.A.; Martínez-García, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *560*, 56-60.
6. Brenchat, A.; Nadal, X.; Romero, L.; Ovalle, S.; Muro, A.; Sánchez-Arroyos, R.; Portillo-Salido, E.; Pujol, M.; Montero, A.; Codony, X.; Burgueño, J.; Zamanillo, D.; Hamon, M.; Maldonado, R.; Vela, J.M. *Pain* **2010**, *149*, 483-494.
7. López-Rodríguez, M.L.; Porras, E.; Benhamú, B.; Ramos, J.A.; Morcillo, M.J.; Lavandera, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1097-1100.
8. López-Rodríguez, M.L.; Porras, E.; Morcillo, M.J.; Benhamú, B.; Soto, L.J.; Lavandera, J.L.; Ramos, J.A.; Olivella, M.; Campillo, M.; Pardo, L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5638-5650.
9. Medina, R.A.; Sallander, J.; Benhamú, B.; Porras, E.; Campillo, M.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M.L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2384-2392.
10. Liu, K.G.; Robichaud, A.J. *Drug Devel. Res.* **2009**, *70*, 145-168.
11. Wilson, C.; Terry, A.V. *Drugs Fut.* **2009**, *34*, 969-975.
12. Hirano, K.; Piers, T.M.; Searle, K.L.; Miller, N.D.; Rutter, A.R.; Chapman, P.F. *Life Sci.* **2009**, *84*, 558-562.
13. Rossé, G.; Schaffhauser, H. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 207-221.
14. Codony, X.; Vela, J.M.; Ramirez, M.J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 94-100.
15. López-Rodríguez, M.L.; Benhamú, B.; de la Fuente, T.; Sanz, A.; Pardo, L.; Campillo, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4216-4219.
16. de la Fuente, T. *Diseño y desarrollo de nuevos antagonistas del receptor serotoninérgico 5-HT₆. Estudio de la interacción ligando-receptor*. Universidad Complutense de Madrid, 2009.
17. de la Fuente, T.; Martín-Fontecha, M.; Sallander, J.; Benhamú, B.; Campillo, M.; Medina, R.A.; Pellissier, L.P.; Claeyssen, S.; Dumuis, A.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M.L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1357-1369.

